Aus dem
Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. P. Karlson

Zur Vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Jan Schlörer
aus Pforzheim

Marburg/Lahn 1969

E. Symon · Foto-Druck · 355 Marburg/L. · Friedrichsstr. 3

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534924_0056

Aus dem
Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. P. Karlson

Zur Vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Jan Schlörer
aus Pforzheim

Marburg/Lahn 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 5. Mai 1969

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.rer.nat.P.Karlson
Referent: Prof.Dr.rer.nat.P.Karlson
Correferent: Doz.Dr.med.C.Sekeris

Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München in den Monaten Oktober 1963 bis März 1964 und im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg in der Zeit vom Mai 1964 bis August 1965 unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.Peter Karlson durchgeführt.

Herrn Professor Karlson möchte ich für sein Interesse, alle großzügige Förderung und geduldige Hilfe beim Entstehen der Arbeit sehr herzlich danken.
Herrn Privatdozenten Dr.C.E.Sekeris bin ich sehr dankbar für die Einführung in die Methodik und viele freundschaftliche Ratschläge. Herrn Dr.H. Hummel verdanke ich die Aufnahme von Infrarotspektren und viele Anregungen.
Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich dafür, daß sie sich stets freundlich und hilfsbereit zeigten.

L E B E N S L A U F

Als Sohn von Dr. med. Wolfgang Schlörer und seiner Frau Clara, geb. Roosen-Runge, wurde ich am 29.6.1941 in Pforzheim geboren, wo ich - abgesehen von einem Aufenthalt in Bretten zwischen 1945 und 1947 - bis 1960 lebte, 1947 - 1951 die Weiherbergschule, 1951 - 1960 das altsprachliche Reuchlin-Gymnasium besuchte und im März 1960 das Abitur ablegte.

Vom Sommersemester 1960 an studierte ich in Freiburg Medizin und hörte in den ersten Semestern im Nebenfach auch zoologische Vorlesungen. Nach dem Physikum wechselte ich im Herbst 1962 nach München. Dort begann ich im Oktober 1963 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität unter der Leitung von Prof. Dr. P. Karlson mit der Arbeit an meiner Dissertation. Mein Lehrer folgte im April 1964 einem Ruf an die Universität Marburg; am dortigen Physiologisch-Chemischen Institut setzte ich die Arbeit in der Zeit bis August 1965 fort. Nach Famulaturen am Städtischen Krankenhaus Pforzheim und an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg legte ich im Wintersemester 1966/7 an der Universität Marburg die ärztliche Prüfung ab.

Als Medizinalassistent arbeitete ich bisher an den Marburger Universitätskliniken für Neurologie, Augenheilkunde, Chirurgie und Dermatologie und seit 1. Oktober 1968 an der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Pforzheim.

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG 1

1. Tyrosinstoffwechsel bei Säugern 2

2. Angeborene Störungen des menschlichen Tyrosinstoffwechsels 7

3. Tyrosinstoffwechsel der Insekten 9

4. Steuerung des Tyrosinstoffwechsels der Insekten . 12

5. Ziel der Arbeit 16

B. EIGENE ERGEBNISSE 17

1. Enzyme des Tyrosinstoffwechsels von Calliphora erythrocephala im Lauf der Entwicklung 17

a) Das N-Acetyl-dopamin-glucosid bildende System . 17

b) Die Phenylalaninhydroxylase 18

c) Besprechung 23

2. Einfluß des N-Acetyl-dopamins auf den Tyrosinstoffwechsel von Calliphora erythrocephala . . 25

a) Gewinnung von kristallinem N-Acetyl-dopamin . . 25

b) Hemmung der Dopadecarboxylase durch N-Acetyl-dopamin in vivo 30

c) Wirkung des N-Acetyl-dopamins auf den Tyrosinstoffwechsel jüngerer Larven 35

3. Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Dopadecarboxylase von Calliphora erythrocephala . . 41

a) Zur Spezifität der Wirkung des N-Acetyl-dopamins 41

b) Wirkung einiger aromatischer und nichtaromatischer α-Ketosäuren 45

c) Komplexbildung des Pyridoxalphosphats 48

C. DISKUSSION 52

D. ZUSAMMENFASSUNG 59

E. EXPERIMENTELLER TEIL 60

1. Allgemeine Methodik 60

2. Beschreibung der Versuche 62

F. LITERATUR 71

G. ANHANG (Lebenslauf, Verzeichnis der akademischen Lehrer) 82

E I N L E I T U N G

Die vergleichenden Disziplinen lieferten von jeher wichtige Beiträge zur Erkenntnis biologischer Zusammenhänge. Großen Gewinn zogen aus diesen Forschungsrichtungen neben der allgemeinen Biologie und der Evolutionstheorie vor allem Humanbiologie und Medizin, da sich der anfangs immer vorsichtige Versuch, an anderen Lebewesen erhobene Befunde auf den Menschen zu übertragen, häufig als erfolgreich erwies.

Diese Entwicklung begann im Bereich der vergleichenden Anatomie und Physiologie. In unserem Jahrhundert folgte die vergleichende Biochemie; in den letzten Jahren gewannen vergleichend psychologische Untersuchungen, deren Resultate sich freilich nur mit besonderer Vorsicht und schwieriger als die anderer Gebiete auf den Menschen anwenden lassen, zusehends Gewicht.

Diesen Sachverhalt können einige Beispiele aus der vergleichenden Biochemie illustrieren. Die Erkenntnis, daß Desoxyribonucleinsäuren Träger der genetischen Information sind, wurde zuerst an Bakterien gewonnen (5). Bei Untersuchungen an Insekten wurde entdeckt, daß Gene, die kleinsten funktionellen Einheiten der genetischen Information, durch die Kontrolle von Stoffwechsel-Ketten wirken können (15,16). Die Wirkung des Verpuppungshormons der Insekten (Ecdyson) auf die Riesenchromosomen in Speicheldrüsen von Insekten war das erste Beispiel für eine Hormonwirkung durch Aktivierung von Genen (2o). Wie Versuche an Rattenleber zeigten, besteht eine wesentliche Wirkung der Glucocorticoide in der Induktion der Synthese von Enzymen des katabolischen Aminosäurenstoffwechsels, der Tryptophanpyrrolase und der Tyrosin-α-ketoglutarat-Transaminase (3o,69,7o,77).

Thema dieser Arbeit ist die vergleichende Biochemie des

Tyrosinstoffwechsels. Vor der Besprechung der eigenen Untersuchungen wird im Folgenden ein kurzer Überblick über wichtige Einzelheiten des Tyrosinstoffwechsels bei Säugern und Insekten gegeben.

1. Tyrosinstoffwechsel bei Säugern

a) Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin

Einen Teil seines Tyrosinbedarfs entnimmt der Säugerorganismus der Nahrung; Tyrosin ist aber keine essentielle Aminosäure, da es, wie EMBDEN und BALDES schon 1913 in Leber-Durchströmungsversuchen zeigen konnten (29), aus Phenylalanin gebildet werden kann. Diese irreversible Reaktion wird durch ein aus zwei Komponenten bestehendes Enzymsystem katalysiert (88,126). Für die Reaktion werden O_2, $NADP \cdot H_2$ und ein Pteridinderivat benötigt, dessen Rolle in vitro die Tetrahydrofolsäure übernehmen kann. KAUFMAN konnte in ausgedehnten Versuchsreihen zeigen, daß der natürliche Cofaktor das 7,8 - Dihydrobiopterin ist, das durch die Sepiapterinreduktase aus Sepiapterin gebildet und durch die Dihydrofolatreduktase (Faktor II) zum Tetra - hydrobiopterin reduziert wird (Abb.1; 67,68).

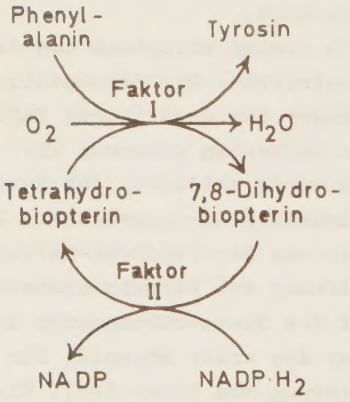


Abb.1: Phenylalaninhydroxylase-System

b) Einbau in Proteine

Wie Phenylalanin wird auch Tyrosin in Proteine eingebaut und bei ihrem Abbau wieder frei.

c) Abbau zu Fumarsäure und Acetessigsäure (Abb.2)

Dieser zuerst von NEUBAUER (96) postulierte Weg ist inzwischen bewiesen. Im ersten Reaktionsschritt wird durch die Tyrosin-α-ketoglutarat-Transaminase die Aminogruppe unter Mitwirkung von Pyridoxalphosphat auf α-Ketoglutarsäure übertragen; es entstehen p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure und Glutaminsäure (17,72). Ein 5oo-fach angereichertes Präparat aus Rattenleber transaminiert neben Tyrosin in geringerem Umfang auch Phenylalanin, Dopa und Tryptophan (53). Die Synthese des Leberenzyms wird durch Glucocorticoide und verschiedene Aminosäuren stimuliert, durch Wachstumshormon gehemmt (69,73,74,77).

Die p-Hydroxy-phenylpyruvat-Oxydase lagert ein Sauerstoffatom an und die Seitenkette um (1o7) und decarboxyliert die entstandene 2,5-Dihydroxy-phenylbrenztraubensäure oxydativ zu Homogentisinsäure (72). TANIGUCHI et al. konnten wahrscheinlich machen, daß das gleiche Enzym auch

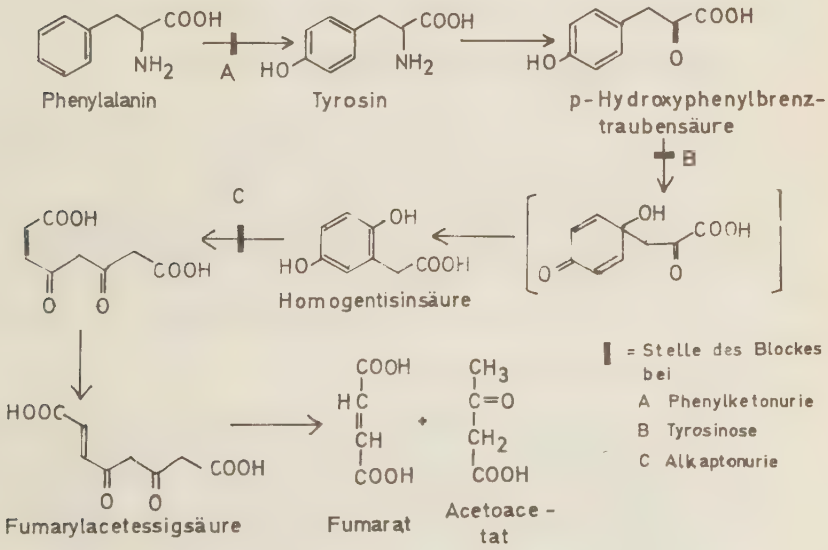


Abb.2: Der katabolische Tyrosinstoffwechsel

die Umwandlung der bei Phenylketonurie in großen Mengen auftretenden Phenylbrenztraubensäure in o-Hydroxy-phenylessigsäure katalysiert (124).

Eine Oxygenase sprengt unter Anlagerung von einem Molekül Sauerstoff zwischen C_1 und C_2 den Ring, wobei die Enolform der Maleyl-acetessigsäure entsteht. Die Reaktion benötigt Eisenionen und Ascorbinsäure (1o6).

Eine Isomerase lagert unter Mitwirkung von Glutathion die cis- in die trans-Form um (71); die entstandene Fumaryl-acetessigsäure (1o4) wird durch eine Hydrolase in Fumarsäure und Acetessigsäure gespalten. Da jedes Molekül Tyrosin ein Molekül Acetessigsäure liefert, gehört Tyrosin zu den ketoplastischen Aminosäuren. Die Fumarsäure wird in den Citronensäurezyklus eingeschleust.

Dieser Weg, bei dem pro Molekül Tyrosin vier Sauerstoffatome verbraucht werden, ist quantitativ der wichtigste; bei Ratten wurden schon vier Stunden nach Injektion radioaktiven Tyrosins 4o % davon als CO_2 wiedergefunden (26).

d) Umwandlung in Schilddrüsenhormone (47)

In der Schilddrüse werden aus dem Blut aufgenommene Jodid-Ionen zu freiem Jod oxydiert und in proteingebundenes Tyrosin eingebaut. Dabei entstehen Monojod- und 3,5-Dijodderivate des Tyrosins. Die Bildung des Diphenyläthersystems verläuft wahrscheinlich über Semichinonradikale (Abb.3). Das entstandene Trijodthyronin oder Thyroxin wird bei Bedarf durch Proteolyse aus dem Thyreoglobulin freigesetzt.

e) Umwandlung in Melanin

Die ersten zwei Syntheseschritte zum in den Melanozyten der Haut gebildeten Dopa-Melanin (Abb.4) werden durch eine kupferhaltige Phenoloxydase katalysiert, die Tyrosinase (18). VANDERWENDE konnte zeigen, daß in Rattengehirn ein Enzym vorhanden ist, das aus Dopamin Melanin bildet, aber Dopa nicht angreift (127). Dieses Dopamin-Melanin hat sehr

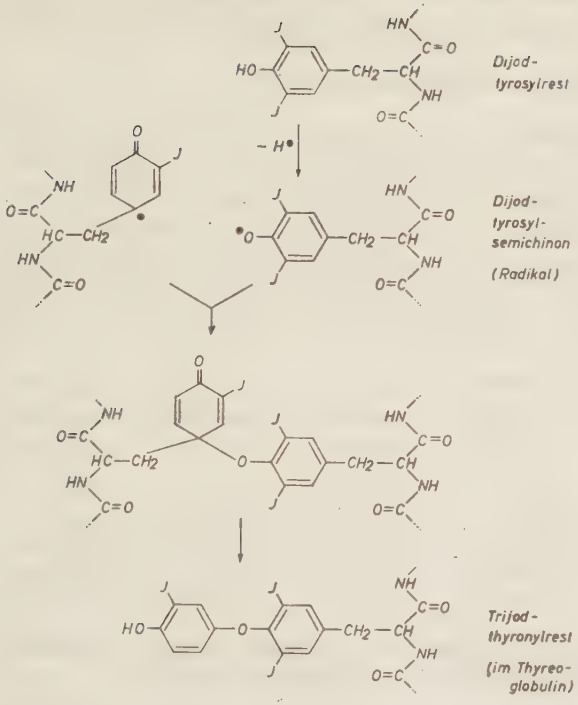
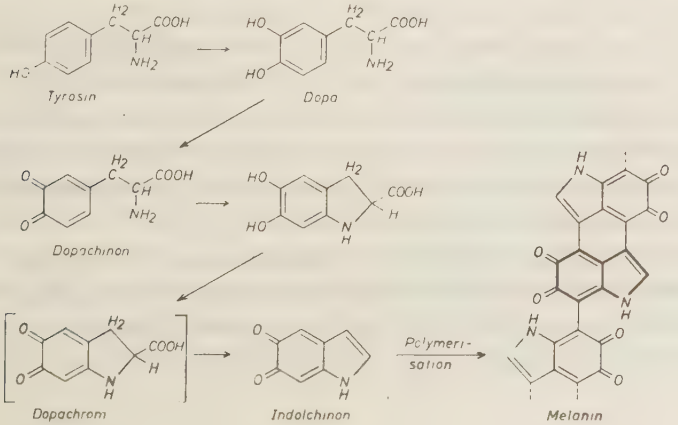


Abb.3: Synthese der Schilddrüsenhormone, nach Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie,6.Aufl.

Abb.4: Synthese des Dopa-Melanins, nach Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie,6.Aufl., Stuttgart 1967 .



wahrscheinlich Bedeutung für die Funktion des Zentralnervensystems, besonders des extrapyramidalen Systems (22).

f) Biosynthese der Catecholamine (Abb.5)

Die Entstehung der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin aus Tyrosin wurde vermutet, seit es HOLTZ (49) gelungen war, die Decarboxylierung von Dopa zu Dopamin nachzuweisen. GURIN bestätigte diese Vermutung, als er in Isotopenversuchen mit radioaktivem Phenylalanin als Ausgangssubstanz radioaktive Catecholamine isolieren konnte (43).

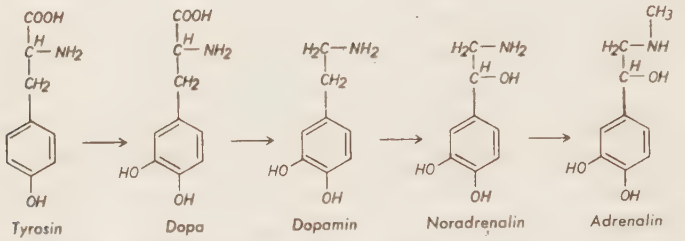


Abb.5: Biosynthese der Catecholamine (Nach: Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 6.Aufl.)

Über den ersten Schritt herrschte am längsten Unklarheit. Erst 1964 konnten NAGATSU, LEVITT und UDENFRIEND eine Tyrosinhydroxylase aus Gehirn und Nebennierenmark mehrerer Tiere anreichern, die eindeutig von der Tyrosinase verschieden war. Das Enzym benötigt Eisenionen und ein Tetrahydropteridin, z.B. Tetrahydrofolsäure (94). Es vermag auch Phenylalanin zu hydroxylieren, wobei sich zwei unabhängige Schritte mit freiem Tyrosin als Zwischenprodukt abspielen (52). Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in Konzentrationen zwischen 10^{-4} und $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l vermindern in vitro die Aktivität aus Gehirn ebenso wie aus Nebennierenmark gewonnener Präparationen um 30 - 50 % (94,100).

Die Anreicherung einer Dopadecarboxylase glückte zuerst 1949 SCHALES, sie benötigt Pyridoxalphosphat (105).Die bisher gefundenen Enzyme decarboxylieren auch 5-Hydroxy-tryptophan (6,80).

Dopamin ist bereits biologisch aktiv. Von der Substantia nigra zum Nucleus caudatus und Putamen ziehen Neuronen mit hohem Dopamingehalt. Ihre Degeneration scheint den Parkinsonismus zu verursachen (3).

Das dritte Enzym der Reihe, die Dopamin-ß-Hydroxylase, wurde 1960 von LEVIN et al. charakterisiert (76); es enthält Kupfer (34). Noradrenalin kann durch aktives Methyl zu Adrenalin N-methyliert werden.

Der Catecholaminhaushalt von Zentralnervensystem und Peripherie ist weitgehend getrennt, da Amine die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreiten. Wo sie fehlt, im Bereich der Eminentia medialis und der Area postrema, nehmen auch zentrale Catecholamin-Neuronen Noradrenalin aus dem Blut auf (37).

g) Decarboxylierung zu Tyramin

Diesen Weg geht nur ein minimaler Teil des Tyrosins. HOLTZ isolierte eine Tyrosindecarboxylase aus Nierenrinde (48). Das Tyramin wird durch eine Amin-Oxydase zu p-Hydroxy-phenylessigsäure abgebaut. Geringe Mengen Tyramin werden zu Dopamin oder, über Norsynephrin, zu Noradrenalin hydroxyliert und in den Catecholaminhaushalt eingeschleust - ein quantitativ bedeutungsloser Weg (23).

2. Angeborene Störungen des menschlichen Tyrosinstoffwechsels

a) Phenylketonurie

Bei der 1934 von FØLLING (32) entdeckten Krankheit fehlt die Phenylalanin-Hydroxylase-Aktivität (55), von dem Leber-Enzymsystem (Abb.1) ist Faktor I mindestens in aktiver Form nicht vorhanden (89,129). Neben hohen Mengen Phenylalanin findet man im Urin von Phenylketonurikern Phenyl-, p-Hydroxy-phenyl- und Indol-brenztraubensäure, ferner die dazu analogen Milchsäure- und Essigsäure-Verbindungen, o-Hydroxy-phenylessigsäure (42,123 c) und Phenacetyl-L-glutamin (132). In neuerer Zeit sind im Urin von Kranken Hippursäure

(41), N-Acetyl-phenylalanin(4o), Phenäthylamin(97) und, vielleicht am interessantesten, Pyridoxyliden-β-phenäthylamin (79) als Phenylalaninmetaboliten gesichert worden. Im Gehirn kommt es zu Myelinisierungsdefekten (2): die Krankheit erzeugt Schwachsinn, der aber durch rechtzeitige Gabe einer Phenylalanin-armen Diät verhindert werden kann (9).

b) Albinismus

Bereits Plinius lieferte eine exakte Beschreibung der Erkrankung. Seit jeher fielen milchweiße Farbe, ausgeprägte Lichtscheu und - wegen ihrer Hautkrebsanfälligkeit - Kurzlebigkeit der Albinos auf. Da die Tyrosinase in den Melanozyten fehlt, kann kein Dopa-Melanin gebildet werden (123 b).

c) Tyrosinose (Tyrosinämie)

MEDES beschrieb 1932 den ersten Patienten mit Tyrosinose (82).* Die Aktivität der p-Hydroxy-phenylpyruvat-Oxydase scheint zu fehlen, die Bildung von Homogentisinsäure ist unmöglich. Klinisch besteht ein Fanconi-Syndrom mit Glucosurie, Phosphaturie, Aminoacidurie, Verfettung und Cirrhose der Leber, Hypokaliämie und Polyurie; die Pathogenese der Symptome ist unklar. Im Urin findet man u.a. p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, Tyrosin und verschiedene Melaninvorstufen (39 a).

Von der Tyrosinose verschieden ist die Tyrosylurie, eine ungefährliche passagere Erscheinung, die vor allem bei Frühgeborenen auftritt. Ursache scheint eine verspätete Aktivierung des Genes für p-Hydroxy-phenylpyruvat-Oxydase, das gewöhnlich seine Arbeit um die 35. Fetalwoche aufnimmt (39 b).

d) Alkaptonurie

Die Krankheit war durch ihr Leitsymptom, die Dunkelfärbung stehengebliebenen Urins, schon im 16. oder 17. Jahrhundert bekannt. Da die Homogentisinsäure-Oxydase fehlt (75), häuft sich Homogentisinsäure an (131) und wird in Knorpel, Bänder und Sehnen eingelagert, die sich dunkel verfärben (Ochronose). Oft kommt es zu Arthritis (123 d).

---

* Neuerdings kam LADU (74 I) zu der Ansicht, der von MEDES untersuchte Patient habe wahrscheinlich statt an Tyrosinose an einem Tyrosintransaminase-Mangel gelitten. Sollte das stimmen, wäre damit der bisher 5. angeborene Enzymdefekt des menschlichen Tyrosinstoffwechsels bekannt.

3. Tyrosinstoffwechsel der Insekten

Der Tyrosinstoffwechsel der Insekten wurde erst in den letzten zwanzig Jahren näher untersucht. Zu den bestuntersuchten Objekten gehört das Versuchstier dieser Arbeit, die Schmeißfliege Calliphora erythrocephala (MEIGEN), von deren Tyrosinstoffwechsel daher im Folgenden häufig ausgegangen wird.

a) Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin

Phenylalanin ist für alle Insekten essentielle Aminosäure, soweit sie nicht, wie z.B. Blatella, Symbionten beherbergen, die den aromatischen Ring synthetisieren können (38). 1956 wies FUKUDA nach, daß der Seidenspinner Bombyx mori Phenylalanin zu Tyrosin hydroxylieren kann (35). BEŁŻECKA et al. konnten 1964 aus verschiedenen Schmetterlingen und Calliphora ein Enzymsystem anreichern, das in allen untersuchten Punkten dem Säugersystem ähnelte. Es bestand aus zwei Teilenzymen, benötigte NAD·H_2 und ein Tetrahydropteridinderivat (8).

b) Stoffwechselwege des Tyrosins bei Insekten

Drei Hauptwege des Tyrosinstoffwechsels sind bei Insekten näher untersucht (Abb.6).

A. Tyrosin kann durch Transaminierung in p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure umgewandelt werden, die weiter zu p-Hydroxy-phenylpropionsäure abgebaut wird (SEKERIS und KARLSON, 117). Homogentisinsäure und andere aus dem Abbauweg der Säuger bekannte Metaboliten fand man bis jetzt bei Insekten nicht (12).

B. Tyrosin wird decarboxyliert, das Tyramin entweder durch eine Amin-Oxydase in p-Hydroxy-phenylessigsäure überführt und eliminiert (117) oder acetyliert und das entstandene N-Acetyl-tyramin (14) durch Hydroxylierung in N-Acetyl-dopamin umgewandelt (KARLSON, SEKERIS und SEKERI; 66).

C. Durch Hydroxylierung entsteht Dopa, das als Metabolit des Insektenstoffwechsels schon 1927 in den Flügeldecken von Maikäfern aufgefunden wurde (108). Die Produkte der folgenden Decarboxylierung und Acetylierung sind nacheinander Do-

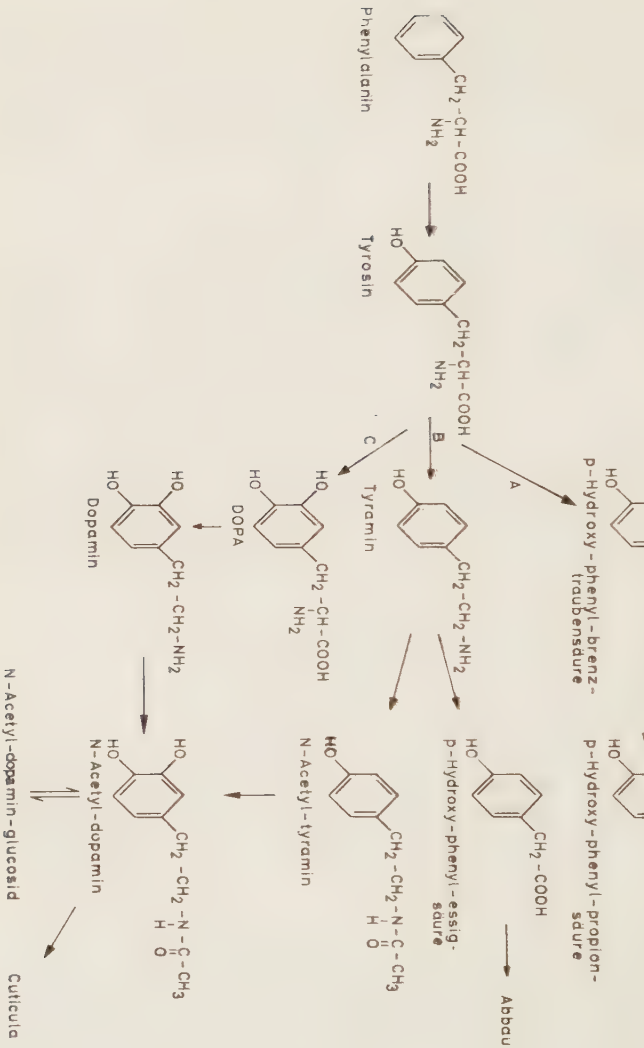


Abb.6: Hauptwege des Tyrosinstoffwechsels der Insekten

pamin und N-Acetyl-dopamin (117). Dopamin kann in geringerem Umfang auch durch Hydroxylierung aus Tyramin entstehen (85, 118). Die Acetylierung von Tyramin und Dopamin besorgt wohl das gleiche Enzymsystem (59). Als Decarboxylasen von Tyrosin und Dopa muß man zwei verschiedene Enzyme annehmen, da die Dopadecarboxylase Tyrosin nicht angreift (113).

N-Acetyl-dopamin wurde nach seiner Entdeckung bei Calliphora auch aus anderen Insekten isoliert (36,63,85). Die Verbindung wurde von KARLSON, SEKERIS und HERRLICH auch aus dem Urin eines Patienten mit malignem Phäochromozytom gewonnen und damit beim Menschen nachgewiesen (65). Weitere bei Insekten gefundene Catecholamine sind Noradrenalin und N-Acetyl-noradrenalin. Bisher konnte keine Funktion dieser Verbindungen im Nervensystem von Insekten gezeigt werden; offenbar beschränkt sich die Rolle der Catecholamine bei Insekten auf ihre Mitwirkung bei der Sklerotisierung (Übersichten: BRUNET, 12; COLHOUN,21; SEKERIS und KARLSON, 118).

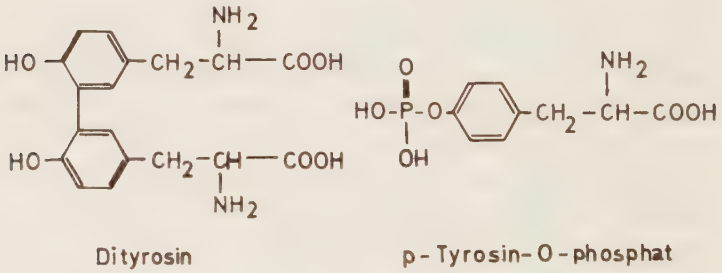
Bei der Dunkelfärbung und Verhärtung (Sklerotisierung) der vorher weißen und weichen Cuticula der Puppe (66) und der frisch geschlüpften Imago (114) wird N-Acetyl-dopamin in die Cuticula eingebaut. Nach heutigen Vorstellungen werden dabei o-Diphenole zu Chinonen oxydiert und gehen mit Cuticulaproteinen eine Verbindung ein (102). Das Diphenoloxydase-System von Calliphora wurde gründlich untersucht (SCHWEIGER und KARLSON, 110; KARLSON und MERGENHAGEN, 61). Es besteht aus einem nur in Cuticula und Epidermis vorkommenden Aktivator und dem in der Hämolymphe lokalisierten Präenzym. N-Acetyl-dopamin, Dopa und Dopamin sind seine bevorzugten Substrate. Möglicherweise besorgt das gleiche Enzym auch die Hydroxylierung von Tyrosin, es besitzt in partikelgebundener Form auch Monophenoloxydase-Aktivität (61). Stark gehemmt wird diese Eingangsreaktion zum Weg C in vitro durch ca $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure (115), den ersten Metaboliten des Wegs A, der allerdings in vivo rasch eliminiert wird.

N-Acetyl-dopamin kann in sein 4-O-β-glucosid umgewandelt werden (66). Diese Verbindung fungiert wahrscheinlich als

N-Acetyl-dopamin-Speicher (114). Ihre Bildung beginnt bei Calliphora etwa am 5.Entwicklungstag und nimmt gegen die Verpuppung hin zu (111). In Puppen liegt N-Acetyl-dopamin ausschließlich als Glucosid vor, einen Tag vor dem Schlüpfen fällt die Glucosidkonzentration ab, einen Tag nach dem Schlüpfen ist kein Glucosid mehr nachweisbar (SEKERIS, 114).

c) Nur bei Insekten bekannte Tyrosinmetaboliten

Erwähnt seien das aus einer Letalmutante von Drosophila isolierte p-Tyrosin-O-phosphat (87) und die Verbindungen Di- und Trityrosin (Abb.7). Die letzten beiden Stoffe sind Bausteine des Resilins, eines vielfach vernetzten Proteins mit gummiähnlichen Eigenschaften, das vor allem an Extremitätengelenken von Insekten auftritt (4).



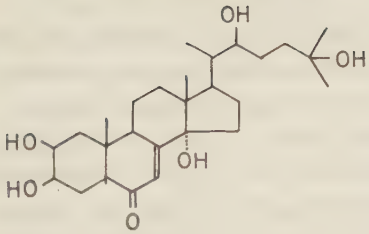
Dityrosin p-Tyrosin-O-phosphat

Abb.7

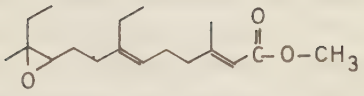
4. Steuerung des Tyrosinstoffwechsels der Insekten

a) Allgemeines

Die Insektenentwicklung verläuft in mehreren Stufen, bei deren Steuerung vor allem zwei Hormone mitwirken, deren Struktur kürzlich ermittelt wurde: das Ecdyson aus der Prothoraxdrüse und das in den Corpora allata gebildete Neotenin (Juvenilhormon) (25,51,60). Beide Drüsen stehen ihrerseits unter der Kontrolle von Gehirnhormonen; die Corpora allata haben Kontakt mit dem Corpus cardiacum, wo - wahrscheinlich



Ecdyson



Neotenin
(Juvenilhormon)

im Gehirn entspringende - neurosekretorische Neuronen enden (128).

Die einzelnen Stadien und den Verlauf des Ecdysontiters (SHAAYA und KARLSON, 12o) in der Entwicklung von Calliphora faßt Abb.9 zusammen. Bei den larvalen Häutungen wirken Neotenin und geringe Mengen Ecdyson zusammen, bei der Verpuppung fehlt das Neotenin (56). Für die Imaginalhäutung ist Ecdyson ebenfalls nötig; Bursicon, ein Proteohormon mit einem Molekulargewicht von etwa 4o ooo, steuert die folgende Dunkelfärbung und Härtung der Cuticula des erwachsenen Insekts (33,86).

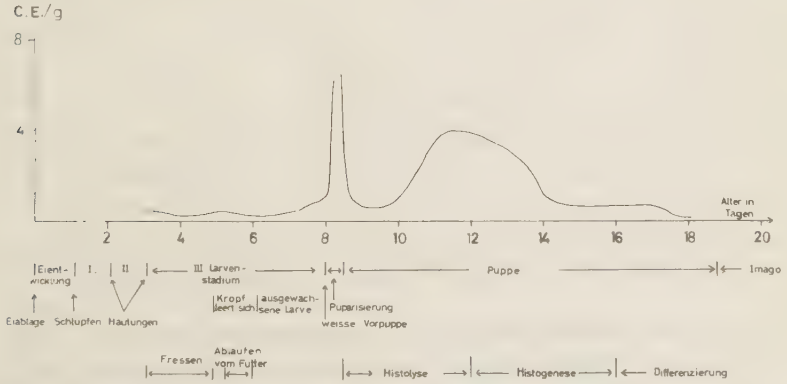


Abb.9: Entwicklungsstadien und Ecdysontiter (12o) bei Calliphora erythrocephala; C.E. = Calliphora - Einheiten.

b) Steuerung des Tyrosinstoffwechsels

Der Tyrosinstoffwechsel von Calliphora verändert sich im Lauf der Entwicklung erheblich (KARLSON und SEKERIS, 64). Tyrosin wird im frühen III. Larvenstadium fast ausschließlich transaminiert (Abb.6, Weg A); Decarboxylierung zu Tyramin (Weg B) spielt nur vorübergehend um den 5. Tag eine Rolle. Besonders auffällig sind die Unterschiede in der Dopaumwandlung (64,112,121). Bei viertägigen Tieren werden von injiziertem Dopa über 9o % transaminiert. Die Decarboxylierung nimmt um den 5.Tag vorübergehend zu (112) und erreicht dann kurz vor der Verpuppung einen steilen Gipfel (121; Abb.1o). Die Transaminierung von Tyrosin und Dopa verliert gegen die Verpuppung hin ständig an Bedeutung.

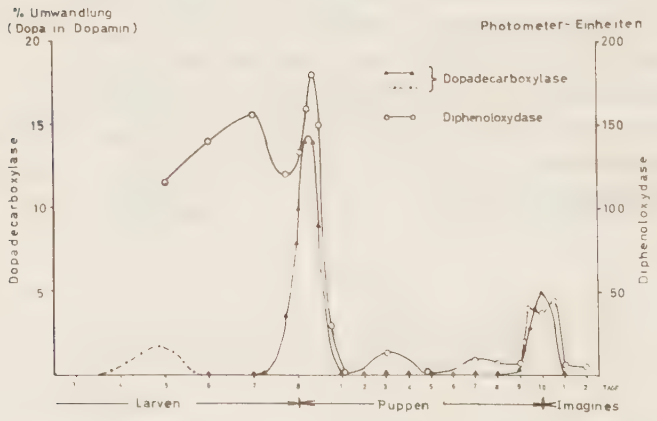


Abb. 1o: Aktivitäten der Dopadecarboxylase und der Diphenoloxydase im Lauf der Entwicklung Calliphoras

Bei dem kleinen Dopadecarboxylase-Maximum um den 5. Tag (112) wurde eventuell die Tyrosindecarboxylase gemessen: die vor der Verpuppung aktive Dopadecarboxylase greift sicher Tyrosin nicht an (113), umgekehrt ist aber nicht bekannt, ob die um den 5. Tag besonders aktive Tyrosindecarboxylase Dopa angreift oder nicht.

Insgesamt überwiegt im frühen III. Larvenstadium der Stoffwechselweg A (Abb.6), im späten III. Stadium Weg C. Vor und während der Imaginalhäutung verläuft der Tyrosinstoffwechsel ähnlich wie bei der Verpuppung (114).

Auf die Umsteuerung des Tyrosinstoffwechsels vor der Verpuppung hat Ecdyson entscheidenden Einfluß. SEKERIS (64,119) konnte nachweisen, daß dieses Hormon in Larven des III. Stadiums die Synthese der Dopadecarboxylase induziert und dadurch die Bildung großer Mengen des bei der Verpuppung nötigen N-Acetyl-dopamins ermöglicht.

Die von SHAAYA et al. (121) erarbeitete Aktivitätskurve der Dopadecarboxylase (Abb.1o) zeigt kurz vor der Verpuppung auffällige Übereinstimmung mit dem Verlauf des Ecdysontiters (Abb.9). Die Entstehung des Dopadecarboxylasemaximums vor dem Schlüpfen ist noch unklar, sicher ist nur, daß Bursicon (S.13) weder hierauf noch auf die Aktivität der Phenoloxydase Einfluß hat (84,85).

Erwähnt sei hier, daß in Calliphora-Puppen eine 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase vorkommt, deren Aktivitätskurve regelmäßig (vor der Verpuppung, am 12. - 13. Tag, vor dem Schlüpfen) ein Minimum erreicht, wenn der Ecdysontiter Maxima zeigt (MARMARAS, SEKERIS und KARLSON; 81).

Die Aktivität der Diphenoloxydase erreicht bei Verpuppung und Schlüpfen Maxima, läuft aber schon bei der Verpuppung nicht eindeutig mit dem Ecdysontiter parallel (Abb.1o; ähnlich auch die nicht eingezeichnete Aktivität der Monophenoloxydase). Das Aktivatorenzym (S.11) erreicht um diese Zeit einen deutlicheren Gipfel (121). Da die Aktivatorkonzentration einige Tage nach Zerstörung der Prothoraxdrüse absinkt, um nach anschließender Ecdysoninjektion wieder zur Norm anzusteigen, beeinflußt Ecdyson wohl auch dieses Enzymsystem (KARLSON und SCHWEIGER, 62).

Das acetylierende System unterliegt in der larvalen Entwicklung keinen größeren Aktivitätsschwankungen und ist von der Ecdysonkonzentration unabhängig (KARLSON und AMMON;59).

5. Ziel der Arbeit

Weitere Informationen über die Enzyme des Tyrosinstoffwechsels von Calliphora und deren hormonelle Regulation sollten erbracht werden.

1. Von den am Stoffwechsel der Sklerotisierungssubstanz N-Acetyl-dopamin beteiligten Enzymen interessierten die Phenylalaninhydroxylase, deren Aktivitätsverlauf in der Entwicklung unbekannt war, und das glucosidbildende System, von dem unbekannt war, ob es schon arbeitet, bevor N-Acetyl-dopamin entsteht, oder ob es von der Ecdysonwirkung abhängt (Teil B 1).

2. Weiter wurde dem Einfluß des Endprodukts N-Acetyl-dopamin auf den Tyrosinstoffwechsel von Calliphora nachgegangen. Es sollte versucht werden, die bisher nur in vitro bekannte Hemmung der Dopadecarboxylase durch diesen Stoff auch in vivo zu demonstrieren und so die Bedeutung dieses Effektes als Rückkopplungsmechanismus zu sichern. Außerdem schien lohnend, der Frage nachzugehen, ob diese Substanz auch auf den noch nicht umgesteuerten Stoffwechsel des frühen III. Larvenstadiums wirken kann (Teil B 2).

3. Die von SEKERIS (113) begonnenen Untersuchungen über Hemmbarkeit der Dopadecarboxylase durch verschiedene Substanzen sollten fortgeführt werden, einmal, um weitere Vergleichsmöglichkeiten zwischen Säuger- und Insekten-Dopadecarboxylasen zu bekommen, besonders aber, weil die Wirkung einiger Verbindungen interessierte, die sich bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten des Menschen anhäufen. Von ihnen war teilweise eine Hemmwirkung auf Säuger-Dopadecarboxylasen bekannt (Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure), teils unbekannt, ob sie Einfluß auf irgendwelche Dopadecarboxylasen haben (α-Keto-isovaleriansäure, α-Keto-isocapronsäure) (Teil B 3).

B. EIGENE ERGEBNISSE

1. Enzyme des Tyrosinstoffwechsels von Calliphora erythrocephala im Lauf der Entwicklung

a) Das N-Acetyl-dopamin-glucosid-bildende System

Das N-Acetyl-dopamin-4-O-β-glucosid wurde zuerst bei Drosophila melanogaster gefunden (OKUBO, 98), SEKERIS identifizierte die Verbindung bei Calliphora (66). Die Substanz taucht in 5-tägigen Tieren zusammen mit N-Acetyl-dopamin auf und bleibt bis zum Schlüpfen der Fliegen nachweisbar (114). 4-tägige Tiere bilden über Tyramin minimale Mengen N-Acetyldopamin; auf Chromatogrammen aus diesen Tieren ist das Glucosid mit Farbreagentien nicht nachweisbar (111). Es war unklar, ob das glucosidbildende System zur ständigen Enzymausrüstung von Calliphora gehört oder erst zusammen mit größeren Mengen N-Acetyl-dopamin erscheint.

Knapp 4-tägige Tiere (jüngere Larven sind für Injektionen zu klein) erhielten eine Injektion inaktiven N-Acetyl-dopamins und C 14-markierter Glucose. Kontrolltiere bekamen nur

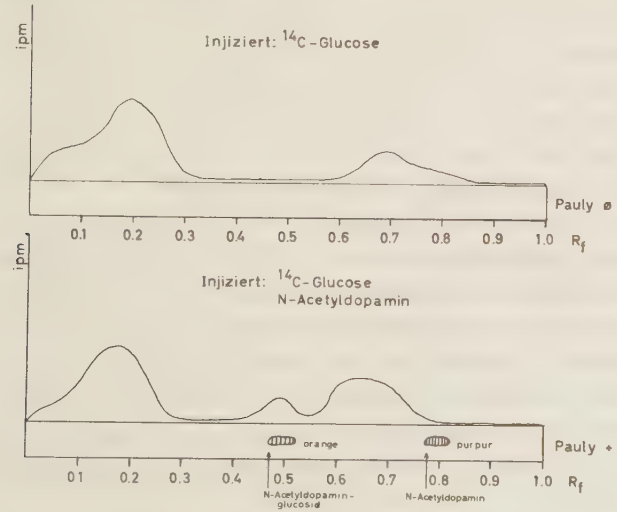


Abb.11: Chromatogramme nach Injektionen von ^{14}C-Glucose und N-Acetyl-dopamin in 4-tägige Larven

Glucose-C 14. Die Tiere wurden nach 6 Stunden homogenisiert, aus den Homogenaten wurden Papierchromatogramme angefertigt (Einzelheiten vergl. exper. Teil).

Abb.11 gibt das Ergebnis der Zählung im Radiopapierchromatographen und der Färbung mit diazotierter Sulfanilsäure (Paulys Reagens) wieder. Der purpurne Fleck bei R_f o.8 entspricht dem injizierten N-Acetyl-dopamin; orange Farbreaktion und der R_f-Wert o.5 sind typisch für das Glucosid. In den verschiedenen Versuchen fanden sich 5 - 1o % der wiedergefundenen Aktivität als Glucosid. Einmal wurden Tiere bereits nach zwei Stunden aufgearbeitet, wobei gleichfalls der Nachweis einer kleinen Glucosidmenge gelang.

Das glucosidbildende System ist also bereits in 4-tägigen Tieren vorhanden; normalerweise läßt sich aus ihnen kein Glucosid nachweisen, weil sie zu wenig N-Acetyl-dopamin enthalten.

b) Die Phenylalaninhydroxylase

Die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin wurde bei Insekten am Seidenspinner Bombyx mori erstmals nachgewiesen (35). Da für Calliphora nur Phenylalanin, nicht aber Tyrosin essentielle Aminosäure ist (38), war anzunehmen, daß die Tiere eine Phenylalaninhydroxylase besitzen. Frühere Versuche, das Enzym aus Calliphora in vitro nachzuweisen, blieben erfolglos. Deshalb wurde eine Untersuchung der Tyrosinbildung in vivo versucht.

Die Tiere bekamen eine Injektion C 14-markierten Phenylalanins; 6 Tiere wurden nach 2 Stunden homogenisiert und das Homogenat in System 1 papierchromatographiert. Dabei traten regelmäßig zwei Aktivitätsgipfel bei R_f o.4 - o.43 und bei R_f o.6 auf, die durch Vergleichschromatogramme in System 1 und 2 als Tyrosin (o.4) und Phenylalanin (o.6) identifiziert wurden. Eine Rechromatographie in System 2 war nötig, weil in den Erstchromatogrammen häufig

ein Teil des Tyrosins am Start hängen blieb. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb.12 und Tab.1 zusammengefaßt. In der Tabelle wurden die Zählergebnisse, der Ausbeute der Methode von etwas über 55 % entsprechend, um den Faktor 1.8 korrigiert (Einzelheiten s. exper.Teil).

Neben der Aktivität der Phenylalaninhydroxylase beeinflussen verschiedene andere Faktoren die Ergebnisse. Phenylalanin und Tyrosin können in Proteine eingebaut werden, wodurch ein Teil der Aktivität verloren geht. Tyrosin kann umgewandelt oder abgebaut werden (Abb. 6), bei Larven und Fliegen kommt die Ausscheidung durch den Darm hinzu. Die Tiere fressen ab dem 5.Tag nicht mehr, ihr Gewicht sinkt bis zum 8. Tag um etwa ein Drittel , bleibt aber dann bis zum Schlüpfen konstant (SHAAYA und KARLSON, 12o).

Die Phenylalaninwerte sind bei Larven des frühen III. Stadiums niedrig, steigen dann an, bleiben in der Puppe zunächst gleichmäßig hoch und sinken erst einige Tage vor dem Schlüpfen wieder ab. Der stark streuende Wert des 11. Tages ist wahrscheinlich zu niedrig. Bei hungernden Tieren sinken die Werte nach dem Schlüpfen weiter stark ab, bei gefütterten Tieren steigen sie wieder etwas an. Die Tyrosinwerte verhalten sich genau umgekehrt.

Tab. 1 zeigt, daß zwischen Verpuppung und Schlüpfen (außer am 11. Tag) ziemlich gleichmäßig 8o - 9o % der injizierten Aktivität zum Zeitpunkt der Aufarbeitung noch als Phenylalanin und Tyrosin vorliegen; die Werte entsprechen zu dieser Zeit, wo auch das Gewicht der Tiere konstant bleibt, am genauesten der Aktivität der Phenylalaninhydroxylase. Diese ist zwischen 1o. und 14. Tag gering und steigt ab dem 15. oder 16. Tag wieder an.

Bei Larven und Fliegen sind die Verluste höher. Neben der Ausscheidung sind daran bei Larven der zu Beginn des III. Stadiums sehr lebhafte, gegen die Verpuppung all -

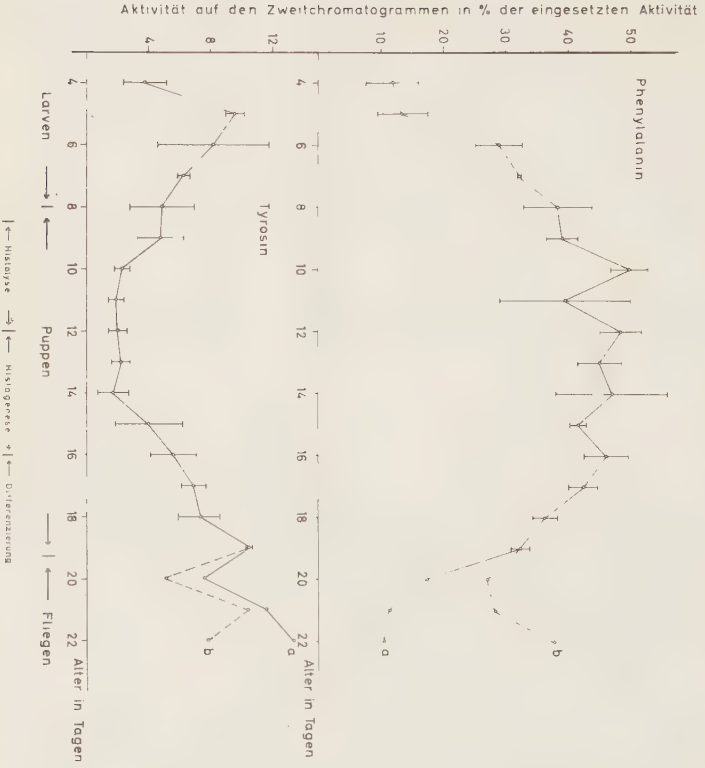


Abb.12: Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin im Lauf der Entwicklung (Ausbeute der Technik etwas über 55 %; die Zählergebnisse sind nicht um den Ausbeutefaktor korrigiert). 2o. - 22. Tag: a = ungefütterte Tiere, b = gefütterte Tiere.

Tab. 1

Wiedergefundene Aktivitäten nach Phenylalanin-C 14-Injektionen. Die Zahlenangaben (in % der gesamten injizierten Aktivität) sind, der Ausbeute der Methode entsprechend, um den Faktor 1.8 korrigiert.

Alter (d)	Zahl der Messungen	Tyrosin	Phenylalanin	Zusammen
4	2	6.8 ± 2.6	21.4 ± 7.7	28.2
5	2	17.1 ± 1.1	24.3 ± 7.4	41.4
6	2	14.8 ± 6.5	52.2 ± 6.7	67.o
7	2	11.3 ± o.7	58.2 ± o.2	69.5
8	2	8.8 ± 3.8	69.1 ± 9.9	77.9
9	3	8.6 ± 2.7	7o.6 ± 4.5	79.2
1o	3	4.1 ± o.9	9o.2 ± 5.4	94.3
11	2	3.4 ± o.9	67.1 ± 18.9	7o.5
12	2	3.6 ± 1.1	87.7 ± 5.8	91.3
13	3	4.o ± 1.1	81.4 ± 6.3	85.4
14	2	3.1 ± 1.8	85.1 ± 16.2	88.2
15	2	7.2 ± 3.9	75.6 ± 2.o	82.8
16	2	1o.1 ± 2.7	83.3 ± 6.5	93.4
17	2	12.4 ± 1.4	76.9 ± 4.3	89.3
18	2	13.3 ± 2.7	65.7 ± 3.4	79.o
19	2	18.9 ± o.4	58.7 ± 2.3	77.4
Ungefütterte Fliegen				
2o	1	13.7	31.5	45.2
21	1	2o.9	2o.5	41.4
22	1	24.1	18.9	43.o
Mit Rohrzuckerlösung gefütterte Fliegen				
2o	1	9.2	49.o	58.2
21	1	2o.7	51.5	72.2
22	1	14.o	68.4	82.4

mählich abnehmende katabolische Tyrosinstoffwechsel und die kurz vor der Verpuppung stark zunehmende Umwandlung des Tyrosins in N-Acetyl-dopamin beteiligt (S.9, S.14). Die Menge des tatsächlich gebildeten Tyrosins ist also, besonders am 4.-5. Tag, größer als die bei der Aufarbeitung gefundene. Da die Menge unverwandelten Phenylala - nins bis zur Verpuppung ständig steigt, die Tyrosinwerte ständig fallen, nimmt die Phenylalaninhydroxylase-Aktivität in dieser Zeit sehr wahrscheinlich ab. Ein Wiederanstieg der Aktivität vor der Verpuppung läßt sich aus der Kurve nicht ablesen.

Nach dem Schlüpfen bleibt die Aktivität bei den mit Rohrzuckerlösung gefütterten Tieren etwa gleich oder sinkt leicht ab. Bei hungernden Fliegen scheint die Kurve ein Ansteigen der Aktivität zu zeigen; eine andere Erklärung für die Werte ist, daß bei Nahrungsentzug in stärkerem Umfang Aminosäuren als Energiequelle herangezogen werden, wodurch - neben der anderer Aminosäuren - auch die Konzentration des Phenylalanins in den Tieren sinkt und inkubiertes Phenylalanin rascher umgesetzt wird. Wahrscheinlich trifft beides zu; dieser Teil des Versuchs zeigt deutlich die Rolle der Phenylalaninhydroxylase als Enzym des katabolischen, energieliefernden Stoffwechsels.

Die Aktivität der Phenylalaninhydroxylase ist also bei Larven des frühen III. Stadiums hoch, erreicht in jungen Puppen ein Minimum und steigt in der zweiten Hälfte der Puppenzeit wieder an. Ausgeprägte Gipfel zur Zeit der Verpuppung und des Schlüpfens fehlen, kleinere Gipfel lassen sich mit der Methode nicht sicher ausschließen, sind aber unwahrscheinlich. Zum Ecdysontiter besteht keine Beziehung, die Aktivitätskurve verläuft anders als die der Dopadecarboxylase und Phenoloxydase (Abb.9, Abb. 1o).

Schnürversuche (Tab. 2) deuten ein Absinken der Enzymaktivität nach 24-stündiger Ausschaltung des Thorax an; in der abgeschnürten Region befinden sich außer der ecdy-

Tab. 2

Phenylalanin-C 14-Injektionen in geschnürte 6-tägige Larven. Die Zählergebnisse sind um den Ausbeutefaktor (1.8) korrigiert. Aufarbeitung der Tiere bereits 1 h nach Injektion.

	Versuch I wiedergefunden		Versuch II wiedergefunden	
Schnürung erfolgte	Tyr	Phe	Tyr	Phe
5 min vor Injektion	6.7	9o.5	3.1	75.2
24 h vor Injektion	3.2	1o6.2	2.2	96.7

sonproduzierenden Prothoraxdrüse noch eine Reihe anderer innersekretorischer Drüsen. Ob eine dieser Drüsen direkten Einfluß auf die Enzymaktivität hat, läßt sich nicht sagen, da die Gegenprobe (Wiederansteigen der Aktivität nach Injektion eines möglicherweise kontrollierenden Hormons) nicht möglich war. Ein Abfall der Aktivität infolge Fehlens von Ecdyson kann allerdings fast sicher ausgeschlossen werden, da KARLSON und BODE (59 I) zeigten, daß in geschnürten Tieren Ecdyson erst nach 5o Stunden zu 5o % inaktiviert ist. Da in geschnürten Tieren die Zirkulation stark reduziert ist (59 I), könnte es sich bei dem Effekt auch um eine Schädigung durch den Schnüreingriff handeln.

Während diese Versuche im Gang waren, berichteten BEŁŻECKA und Mitarbeiter (8) über den Nachweis von Phenylalaninhydroxylase aus verschiedenen Insekten, darunter Calliphora, in vitro (s.S. 9). Während das Enzym in Raupen von Celerio euphorbiae und Bombyx mori gefunden wurde, gelang dies bei Puppen beider Insektenarten nicht, was gut mit den hier beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt. Calliphorapuppen wurden von diesen Autoren nicht untersucht.

c) Besprechung

Bei Tieren des frühen III. Larvenstadiums, die normalerweise keine nachweisbaren Mengen N-Acetyl-dopamin-glucosid bilden, wurde die Fähigkeit zur Synthese dieser Verbindung nachgewiesen.

Für einen Einbau des Glucosids in die Cuticula gibt es keinen Hinweis. In Puppen liegt fast alles vorhandene N-Acetyl-dopamin als Glucosid vor; einen Tag vor dem Schlüpfen tritt freies N-Acetyl-dopamin auf, zugleich sinkt die Glucosidkonzentration. Einen Tag nach dem Schlüpfen ist das Glucosid verschwunden, es scheint vor allem als Speicher für N-Acetyl-dopamin zu dienen (SEKERIS, 114). Eine ähnliche Rolle wurde für das Glucosid der Protocatechusäure in den Collateraldrüsen von Schaben beschrieben (BRUNET und KENT, 13).

Auch eine Detoxikationsfunktion ist denkbar. β-Glucosidbildung zur Entgiftung von Phenolen ist (in Analogie zur Glucuronidbildung bei Säugern) bei Insekten häufig (SMITH, 122). Injektion hoher Dosen N-Acetyl-dopamin (2oo γ/Tier) tötet 4-tägige Calliphoralarven (s.S.41).

Das glucosidbildende System hat keine Schlüsselstellung im Sklerotisierungsstoffwechsel von Calliphora , daher ist sein plötzliches Auftauchen oder Verschwinden im Lauf der Entwicklung unnötig.

Auch die Phenylalaninhydroxylase findet sich bei Tieren aller untersuchten Altersstufen, unterliegt allerdings drastischen Aktivitätsschwankungen im Lauf der Entwicklung. Sie hat zwei Funktionen:

1. Bereitstellung von Tyrosin als Ausgangssubstanz für das bei Verpuppung und Schlüpfen nötige N-Acetyl-dopamin.

2. Einschleusen des Phenylalanins in den katabolischen, energieliefernden Stoffwechsel.

Die gefundene Aktivitätskurve paßt vor allem zur zweiten Funktion. Eine U-förmige Kurve des respiratorischen Stoffwechsels und der Aktivitäten seiner Enzyme ist bei vielen Insekten, darunter auch Calliphora (AGRELL, 1) bekannt. Die respiratorische Aktivität der Puppe sinkt während der Histolyse und steigt während der Histogenese und Differenzierung (Abb. 9) allmählich wieder an. Die Aktivitätskurve der Phenylalaninhydroxylase verläuft ebenfalls U-förmig.

Die Bereitstellung von Tyrosin für die Sklerotisierung

bei Verpuppung und Schlüpfen wird dadurch nicht beeinträchtigt, da die Phenylalaninhydroxylase-Aktivität zu diesen Zeiten relativ hoch ist. Eine direkte Abhängigkeit des Enzyms von Ecdyson fehlt. Bursicon hat offenbar auch keinen Einfluß, da es nur unmittelbar vor und während der Aushärtung und Dunkelfärbung der Fliegen - cuticula ausgeschüttet wird (33), die Enzymaktivität aber schon vier Tage vor dem Schlüpfen zu steigen beginnt.

2. Einfluß des N-Acetyl-dopamins auf den Tyrosinstoffwechsel von Calliphora erythrocephala

a) Gewinnung von kristallinem N-Acetyl-dopamin

Die Synthese des N-Acetyl-dopamins wurde von SEKERIS beschrieben. Bisher war nicht gelungen, die Substanz zu kristallisieren; in einem Fall wurde ein kristalliner Komplex aus N-Acetyl-dopamin und Essigsäureäthylester gewonnen (KARLSON, SEKERIS und SEKERI, 66).

In N_2-Atmosphäre werden 800 mg Dopaminhydrochlorid in 16 ml Dioxan und 19 ml Acetanhydrid solange gekocht, bis - nach 4 bis 6 Stunden - das Dopamin völlig in Lösung gegangen ist. Es entsteht Dopamintriacetat. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand bleibt zur Hydrolyse 30 Stunden bei 0° in 6 ml 20 %-iger äthanolischer HCl stehen. Es wird wieder am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Al_2O_3 (Stufe IV) gereinigt: zuerst wird mit Essigsäureäthylester : Methanol = 9 : 1 das noch enthaltene Triacetat entfernt, anschliessend kann man mit einem 6.5 : 1 - Gemisch der gleichen Lösungsmittel das N-Acetyl-dopamin eluieren.

Um den Anteil der Verunreinigungen am Rohprodukt zu senken, wurde die früher verwendete (aus 37 %-iger HCl durch Äthanolzugabe hergestellte) 2o %-ige äthanolische HCl ersetzt durch das doppelte Volumen einer praktisch wasserfreien 11 %-igen äthanolischen HCl, zu deren Herstellung HCl-Gas in absolutes Äthanol geleitet wurde. In dieser HCl ließ sich die Hydrolyse bis zu einer Dauer von 4o Stunden fortsetzen, ohne daß die N-Acetyl-Gruppe in wesentlichem Umfang abgespalten wurde. Das so gewonnene Produkt war papierchromatographisch meist schon einheitlich; es kristallisierte auch meist schon aus, wenn man die HCl an einem Hochvakuum-Rotationsverdampfer mit stark (- 20° C) gekühlter Vorlage abzog.

Da diese Kristalle schwierig auf die Chromatographiesäule zu übertragen waren und auf der Säule regelmäßig durch im Detail unbekannte Reaktionen erhebliche Ausbeuteverluste entstanden, wurde die Chromatographie zeitweilig weggelassen und durch Umkristallisieren nach der unten beschriebenen Methode eine weitere Reinigung des Produkts versucht. Die Infrarotspektren der dabei entstandenen Kristalle waren aber so schlecht, daß der Gedanke wieder aufgegeben wurde. Die verlustreiche Säulenchromatographie mußte also durchgeführt werden.

Kristalle wurden auf folgendem Weg gewonnen: Das schmierige und sehr luftempfindliche Chromatographieprodukt wurde unter N_2 mit Hilfe leichten Erwärmens im kleinstmöglichen Volumen Methanol : Wasser 1:4 gelöst. Die Lösung wurde wenige Minuten, bis zum Aufschießen der ersten Kristalle, bei - 20°, dann 1 - 2 Tage bei 0° C gehalten. Die Mutterlauge wurde abgehebert, die Kristalle nacheinander mit Benzol und Dichlormethan gewaschen. Das ganze Verfahren wurde wiederholt, die neuen Kristalle im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Weiteres Umkristallisieren verbesserte die Eigenschaften der Kristalle nicht mehr.

Es gelang nur auf diesem Weg, Kristalle zu gewinnen. Alle

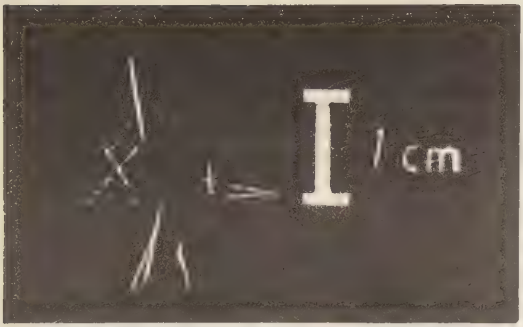
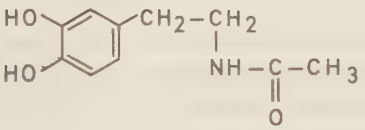


Abb. 13
N-Acetyl-dopamin-Kristalle

Versuche, mit anderen Lösungsmitteln Kristalle zu erhalten, scheiterten. Z.B. löste sich zwar N-Acetyl-dopamin in Cyclohexan schwer, beim unvermeidlichen Kühlen kristallisierte aber das Lösungsmittel vor N-Acetyl-dopamin aus. Auch kein Dichlormethan-haltiges Gemisch wurde gefunden, in dem sich N-Acetyl-dopamin ohne (zu vermeidendes) heftiges Erwärmen löste, und zugleich eine Phasentrennung ausblieb. Pyridin ließ sich zu schwer aus der sehr empfindlichen Substanz entfernen.



N-Acetyl-dopamin

Abb.14 - N-Acetyl-dopamin

Eigenschaften der Kristalle:

Weiße, geruch- und geschmacklose Nadeln (Abb. 13), in allen Fällen papierchromatographisch einheitlich (Untersuchung der Chromatogramme mit Farbreagentien - s.exper.Teil - und unter der UV-Lampe bei 254 und 350 mμ).

Schmelzpunkt: Kein Schmelzpunkt, sondern konstanter Schmelzbereich. Zwischen 56 und 69 ° C langsames gleichmäßiges Abschmelzen von außen nach innen. Beim Abkühlen

kristallisiert die Substanz nicht wieder aus. Neben geringen Verunreinigungen scheint die bei Erwärmen an Luft beginnende Oxydation der empfindlichen Substanz Ursache dieses Verhaltens zu sein; es tritt eine ganz leichte Braunfärbung der Schmelze ein.

Analyse:

N-Acetyl-dopamin ($C_{10}H_{13}NO_3$; MG 195.1) errechnet		Analyse der Kristalle		N-Acetyl-dopamin · 1 H_2O ($C_{10}H_{15}NO_4$; MG 213.2) errechnet	
C	61.52	C	56.29	C	56.32
H	6.71	H	6.87	H	7.08
O	24.60	O	30.11	O	30.03
N	7.17	N	6.54	N	6.57

Die Analyse spricht für einen Komplex aus N-Acetyl-dopamin und einem Molekül Wasser. Die Abweichungen der Werte für H und O sprechen für eine geringe, teilweise Oxydation der Substanz.

Ultraviolett-Spektrum (Abb. 15):

	Nach Säulenchromatographie	Ohne Säulenchromatographie
Maximum bei	280 mμ	280 mμ
Minimum bei	250 mμ	250 mμ
ε_{280}	2880	2620
E_{280}/E_{230}	0.6898	0.6849

Infrarot-Spektrum (Abb. 16):

Interpretation: Breite Bande von 2.8 bis 3.7 μ: OH-, NH- und CH_2-Valenzschwingungen (2.85 μ ≙ 3500 cm^{-1}: OH- (?) ; 2.965 und 3.100 μ ≙ 3370 und 3220 cm^{-1}: -NH- ; 3.42 μ ≙ 2928 cm^{-1}: $-CH_2-$ (?)).

Banden bei 6.16 und 6.48 μ (≙ 1625 und 1545 cm^{-1}): Sekundäres Amid (Säureamidbindung).

Banden bei 12.25 und 12.73 μ (≙ 815 und 785 cm^{-1}): γ - Schwingungen eines 1,2,4-substituierten Phenols im langwelligen Bereich.

Bei 5.8 μ, wo die Arylester-Bande liegen würde, keine Bande: keine im IR-Spektrum nachweisbaren Mengen Di- oder Triacetat enthalten.(Angaben nach BELLAMY, 7)

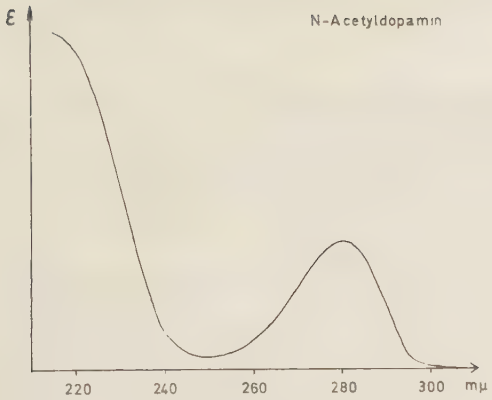
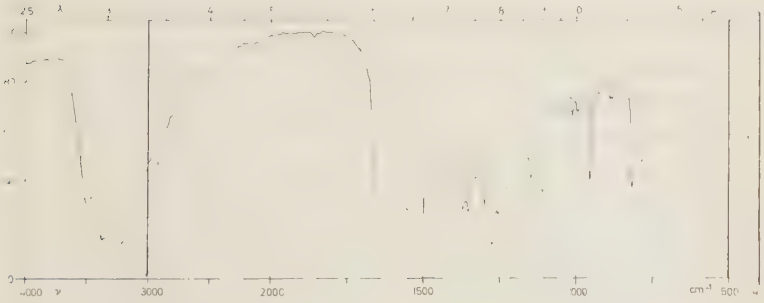


Abb. 15: UV-Spektrum von N-Acetyl-dopamin (nach Säulenchromatographie, in Phosphatpuffer pH 6.9)

Abb. 16: Infrarot-Spektrum von N-Acetyl-dopamin



Die Substanz ist nicht ganz rein, ein besseres Resultat läßt sich ohne anderen Weg zum Umkristallisieren wohl nicht erreichen. Analyse und andere Untersuchungen zeigen, daß keine wesentlichen Verunreinigungen enthalten sind.

b) Hemmung der Dopadecarboxylase durch N-Acetyl-dopamin in vivo

1963 fand SEKERIS (113), daß N-Acetyl-dopamin die Dopadecarboxylase von Calliphora in vitro hemmt. Weil diese Wirkung einen Kontrollmechanismus bei der N-Acetyl-dopamin-Biosynthese darstellen könnte, interessierte, ob sie sich auch in vivo zeigen ließ.

Die Resultate der ersten Versuche an 8-tägigen Tieren und Vorpuppen waren unübersichtlich und wechselnd. Die Aktivität der Dopadecarboxylase steigt vor der Verpuppung sehr steil an (Abb. 1o); die Tiere sind auch unter guten Zuchtbedingungem nicht ausreichend synchronisiert, um zur gleichen Zeit alle genau gleiche Aktivität zu zeigen.

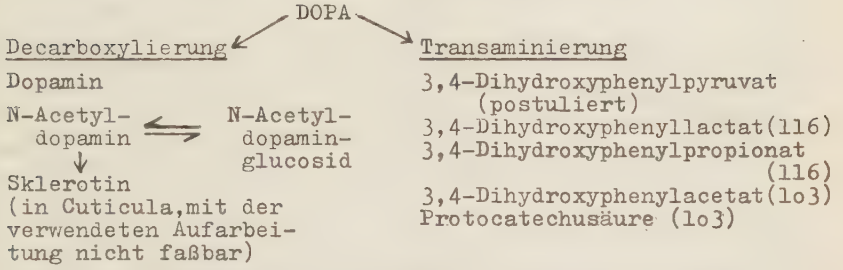
Als brauchbares Kriterium für die Auswahl physiologisch etwa gleichaltriger Tiere erwies es sich schließlich, nur solche weißen Vorpuppen zu verwenden, die sich auf Licht- und Berührungsreiz noch wieder bewegten. (Die Verwandlung einer Larve des III. Stadiums in eine weiße Vorpuppe beginnt mit einer allgemeinen Muskelkontraktion des Tieres, das dabei unbeweglich wird und die äußere Form einer Puppe annimmt. Die Umwandlung in eine Puppe wird dann durch Braunfärbung der Cuticula angezeigt)

Tabelle 3

Versuch	Dauer (min)	Konzentration von N-Acetyl-dopamin in den Versuchstieren (mMol/g Lebendgewicht)
1	25	$4.2 \cdot 1o^{-3}$
2	25	$3.9 \cdot 1o^{-3}$
3	25	$5.3 \cdot 1o^{-3}$
4	45	$3.4 \cdot 1o^{-3}$
5	45	$2.7 \cdot 1o^{-3}$

Die Versuchstiere erhielten Injektionen von Dopa-2-C-14 und inaktivem N-Acetyl-dopamin in wässriger Lösung, die Kontrolltiere nur Dopa-2-C-14 im gleichen Volumen (Tab.3). Aus den Tieren wurden zu den angegebenen Zeiten methanolische Extrakte hergestellt, die papierchromatographisch aufgetrennt wurden (vergl. exper. Teil).

Mögliche Umwandlungen von Dopa in Calliphora



Dopa kann in Calliphora den oben zusammengefaßten Reaktionen unterliegen. Bei zwei Versuchen wurde eine Elektrophorese der Metaboliten durchgeführt, um festzustellen, ob Transaminierungsprodukte (Säuren, die rasch eliminiert werden) faßbar waren. Diese Verbindungen machten in beiden Fällen unter 1 % der wiedergefundenen Aktivität aus. Es ließ sich nicht entscheiden, ob Kontroll- und Versuchstiere verschieden große Mengen davon enthielten.

Tab. 4 und Abb. 17 geben die Versuchsergebnisse wieder. Bei den Versuchen 1 - 3 und 5 fand sich bei Kontroll- und Versuchstieren je etwa der gleiche Prozentsatz der gesamten injizierten Aktivität wieder. Bei Versuch 4 ging offenbar während der Aufarbeitung ein Teil der Aktivität aus den Kontrolltieren verloren. Die zuerst durchgeführten Versuche 4 und 5 dauerten mit 45 min zu lang, so daß nur wenig von der injizierten Aktivität noch nachweisbar war. Daher sollen nur die Versuche 1-3 näher besprochen werden, bei denen (unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Ausbeute der Methode von 65 %) zum Zeitpunkt der Aufarbeitung noch zwischen 80 und 100 % der injizierten Aktivität nachweisbar waren.

Das injizierte Dopa-2-C 14 (Bruchteile eines Gamma) spielte quantitativ keine Rolle, wohl aber das injizierte N-Acetyl-dopamin: es vergrößerte erheblich die Gesamtmenge dieser Substanz, die den Versuchstieren für den Einbau in die Cuticula und Umwandlung in die Speicherform (das

Tab. 4

Ver- such	Sub- stanz	% der wiedergefundenen Aktivität K	V	V : K (K=1)	% der injizierten Aktivität K	V	V : K (K=1)
1	Dopa	82.o	86.9	1.o6	54.8	58.4	1.o7
	Dopamin	1o.9	8.3	o.76	7.3	5.5	o.75
25'	N-Ac-d	3.o	3.o	1.oo	2.o	2.o	1.oo
	N-Ac-d-g	4.1	1.8	o.44	2.8	1.2	o.43
	Zusammen	1oo.o	1oo.o	-	66.9	68.1	1.o2
	Metabol.	18.o	13.1	o.73	12.1	8.7	o.72
2	Dopa	75.9	85.7	1.13	4o.2	44.2	1.1o
	Dopamin	12.1	7.9	o.65	6.4	4.1	o.64
25'	N-Ac-d	3.6	3.9	1.o8	1.9	2.o	1.o5
	N-Ac-d-g	8.4	2.5	o.3o	4.4	1.3	o.3o
	Zusammen	1oo.o	1oo.o	-	52.9	51.6	o.97
	Metabol.	24.1	14.3	o.59	12.7	7.4	o.58
3	Dopa	89.7	91.8	1.o2	54.9	57.6	1.o5
	Dopamin	6.6	5.7	o.86	4.o	3.5	o.88
25'	N-Ac-d	1.6	1.7	1.o6	1.o	1.1	1.1o
	N-Ac-d-g	2.1	o.8	o.38	1.3	o.5	o.37
	Zusammen	1oo.o	1oo.o	-	61.2	62.7	1.o2
	Metabol.	1o.3	8.2	o.8o	6.3	5.1	o.81
4	Dopa	8o.1	81.6	1.o2	14.6	19.7	1.35
	Dopamin	8.o	7.4	o.92	1.5	1.8	1.2o
45'	N-Ac-d	1.3	7.2	5.54	o.3	1.7	5.67
	N-Ac-d-g	1o.6	3.8	o.36	1.9	o.9	o.47
	Zusammen	1oo.o	1oo.o	-	18.3	24.1	1.32
	Metabol.	19.9	18.4	o.93	3.7	4.4	1.24
5	Dopa	76.o	8o.9	1.o6	16.2	16.9	1.o4
	Dopamin	6.5	4.8	o.74	1.4	1.o	o.71
45'	N-Ac-d	1o.1	8.2	o.81	2.2	1.7	o.77
	N-Ac-d-g	7.4	6.1	o.82	1.6	1.3	o.81
	Zusammen	1oo.o	1oo.o	-	21.3	2o.9	o.98
	Metabol.	24.o	19.1	o.79	5.2	4.o	o.77

Die jeweilige Versuchsdauer ist unter der Versuchsnummer aufgeführt. Bei den Angaben in % der gesamten injizierten Aktivität wurde nicht um einen Ausbeutefaktor korrigiert (die durchschnittliche Ausbeute der Methode betrug 65 %).

Abkürzungen: V = Versuchstiere
K = Kontrolltiere
N-Ac-d = N-Acetyl-dopamin
N-Ac-d-g = N-Acetyl-dopamin-glucosid
Metabol. = Metaboliten

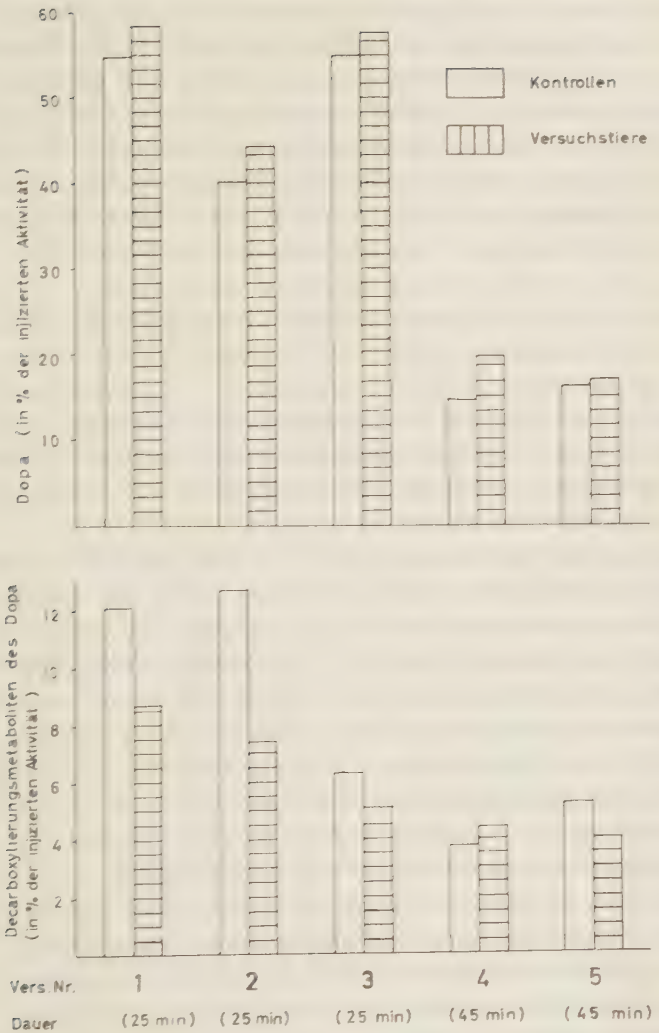


Abb. 17: Unverwandeltes Dopa und Decarboxylierungsmetaboliten des Dopa nach Injektionen von Dopa-2-C 14 und inaktivem N-Acetyl-dopamin an weiße Vorpuppen. Die Kontrolltiere erhielten nur Dopa-2-C 14.

Glucosid) zur Verfügung stand. N e u aus Dopa gebildetes, radioaktiv markiertes N-Acetyl-dopamin machte bei den Versuchstieren einen geringeren Prozentsatz dieser Substanz als bei Kontrolltieren aus und sollte daher einmal langsamer in das Glucosid, zweitens langsamer in die Cuticula eingebaut werden (wo es sich dem Nachweis mit der benutzten Technik entzieht). Wirklich war das Verhältnis zwischen N-Acetyl-dopamin aus Versuchs- und Kontrolltieren in Versuch 1 - 3 relativ hoch (1.oo, 1.o5, 1.1o; Tabelle 4, letzte senkrechte Spalte), für das Glucosid besonders niedrig (o.43, o.3o, o.37), während es für Dopamin (o.75, o.64, o.88) etwa gleich hoch war wie für alle Decarboxylierungsmetaboliten zusammen (o.72, o.58, o.81).

Bei den Versuchstieren der Versuche 1 - 3 fanden sich durchschnittlich über 5 % mehr unverwandeltes Dopa und etwa 25 % weniger Decarboxylierungsmetaboliten als bei den Kontrolltieren. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Hemmung der Dopadecarboxylase an.

In vitro wird das Enzym durch $1.7 \cdot 1o^{-3}$ Mol/l N-Acetyl-dopamin zu etwa 35 % gehemmt (SEKERIS, 113), die Hemmung liegt also in vivo und in vitro im Bereich der gleichen Größenordnung. In vitro scheint die Hemmung etwas stärker, was aber nicht ganz sicher ist: nimmt man an, daß radioaktives N-Acetyl-dopamin bei Versuchstieren langsamer in die Cuticula verschwindet - die gefundenen Relationen zwischen N-Acetyl-dopamin in Versuchs- und Kontrolltieren sprechen dafür - , ist der Effekt in vivo stärker, als die gefundenen Metabolitenquotienten ausdrücken.

Ob N-Acetyl-dopamin am Enzym selber angreift oder einen Komplex mit dem Coenzym der Dopadecarboxylase eingeht, wurde in spektroskopischen Messungen geprüft: in vitro bildet N-Acetyl-dopamin keinen Komplex mit Pyridoxal - phosphat (S.51).

Ferner weiß man, daß Chinone und potentielle Chinone (zu denen N-Acetyl-dopamin gehört), dadurch unspezifische

Enzymhemmungen verursachen können, daß bei einer Reaktion zwischen der Chinongruppierung und freien NH_2- oder SH-Gruppen des Proteins Änderungen der Tertiärstruktur des Enzyms eintreten (19 b). Deshalb wurden bei in vitro-Versuchen (S.42)den Ansätzen Reduktionsmittel (Cystein, Glutathion) zugesetzt, die eine Chinonbildung verhindern sollten. Es zeigte sich, daß Chinonbildung keine wesentliche Ursache für den Einfluß des N-Acetyl-dopamins auf die Dopadecarboxylase sein kann.

c) Wirkung des N-Acetyl-dopamins auf den Tyrosinstoffwechsel jüngerer Larven

In 4-tägigen Calliphoralarven werden 90 % von injiziertem Tyrosin oder Dopa transaminiert, die Transaminaseaktivität sinkt zur Verpuppung hin stark (64, 117). Um den 5. Tag steigt vorübergehend die Aktivität der Tyrosindecarboxylase; das entstandene Tyramin kann durch eine Aminoxydase in p-Hydroxy-phenylessigsäure überführt und weiter abgebaut oder durch N-Acetylierung und Hydroxylierung in 3-Stellung in N-Acetyl-dopamin verwandelt werden (117). Den Verlauf der Dopadecarboxylaseaktivität zwischen dem 3. und 10. Tag der Entwicklung stellt Abb. 18 dar (112, 121). Es ist offen, ob der erste Aktivitätsgipfel nicht der Tyrosindecarboxylase entspricht, die möglicherweise auch Dopa angreift (s.S. 14).

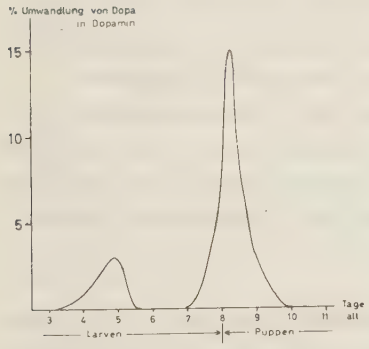


Abb. 18: Decarboxylierung von Dopa vom 3. - 10. Tag der Entwicklung (Nach SEKERIS, 112; SHAAYA und SEKERIS, 121).

Um festzustellen, ob N-Acetyl-dopamin auch auf den Tyrosinstoffwechsel jüngerer Larven einen Einfluß hat, wurden knapp 4-tägigen (Versuch 1 - 4) und knapp 5-tägigen (Versuch 5 - 6) Tieren kombinierte Injektionen von generell markiertem Tyrosin-C 14 und inaktivem N-Acetyl-dopamin verabreicht. Die Versuchsbedingungen zeigt Tab. 5. Die Tiere für Versuch 1 und 2 stammten aus einer anderen Zucht (München) als die für Versuch 3 - 6 (Marburg), die Tiere waren also physiologisch nicht sicher genau gleichaltrig, da schon unter konstanten Zuchtbedingungen das physiologische Alter der Tiere schwankte.

Die Homogenate wurden durch Papierchromatographie und (Versuch 3 - 5) Papierelektrophoresen aufgetrennt. Die einzelnen radioaktiven Metaboliten wurden durch ihr Verhalten bei diesen Verfahren, Vergleichssubstanzen und Farbreaktionen identifiziert und ihre Menge im Methandurchfluß- oder Szintillationszähler gemessen (Einzelheiten s. exper. Teil). Gefunden wurden neben Tyrosin: Tyramin, N-Acetyl-tyramin, N-Acetyl-dopamin, dessen Glucosid, Phenolcarbonsäuren (wegen ihrer geringen Mengen und ihres gleichen Verhaltens waren p-Hydroxy-phenylpropion- und -essigsäure nicht zu differenzieren) sowie ganz geringe Mengen nicht identifizierter nichtphenolischer Säuren. Dopa oder Dopamin wurden in keinem Fall gefunden.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 6 wiedergegeben. Da die Chromatogramme, um weitere Aufarbeitung zu ermöglichen, im Methandurchflußzähler, die Elektrophoresen aber (mit höherer Ausbeute) im Szintillationszähler ausgezählt wurden, sind die absoluten Zahlen aus beiden nicht direkt vergleichbar.

In allen Elektrophoresen fanden sich bei den Versuchstieren weniger radioaktives Tyramin und N-Acetyl-Verbindungen (N-Acetyl-tyramin, -dopamin und -dopamin-glucosid) als bei den Kontrolltieren des entsprechenden Versuchs. Die besondere Höhe des Wertes für Tyramin bei den Kontrolltieren aus Versuch 3 (kein Schreibfehler) ist nicht recht erklär-

Tab. 5

Versuchsbedingungen

Vers. Nr.	Alter der Tiere bei Versuchsbeginn(d)	Zucht	Gewicht der Tiere (mg)	1. Injektion Kontrolltiere, H_2O (µl)	Versuchstiere N-Acetyl-dopamin(γ,µl/T)
1a	knapp 4	München	?	5	125, 5
1b	"	"	?	5	125, 5
2a	"	"	?	5	125, 5
2b	"	"	?	5	125, 5
3	"	Marburg	52	5	9o, 5
4	"	"	73	5	9o, 5
5	knapp 5	"	76	8	8o, 8
6	"	"	8o	8	8o, 8

Vers. Nr.	N-Acetyl-dopamin in mMol/ g Lebendgewicht (Versuchstiere, §)	2.Injektion (Versuchs- =Kontrolltiere); Tyrosin-U-C 14 (dpm, µl/ Tier, §§)		Intervall 1./2. Inj.	Aufarbeitung (h nach 2. Injektion)
1a	?	6o ooo,	5	0 h	0 h
1b	?	6o ooo,	5	0 h	17 h
2a	?	5o ooo,	5	4 h	5 h
2b	?	5o ooo,	5	4 h	17 h
3	8.3×10^{-3}	5o ooo,	4	3 h	5 h
4	5.8×10^{-3}	5o ooo,	4	3 h	5 h
5	4.9×10^{-3}	5o ooo,	5	7 h	11 h
6	4.7×10^{-3}	1oo ooo,	5	7 h	11 h

Vers. Nr.	Tiere/ Aufarbeitung	Ges.injizierte Aktivität/Aufarbeitung(dpm, §§
1a,b	5	3oo ooo
2a,b	5	25o ooo
3	1o	5oo ooo
4	7	35o ooo
5	1o	5oo ooo
6	1o	1 ooo ooo

§:Molekulargewicht N-Acetyl-dopamin·1 H_2O = 213

§§:dpm(decays/min)=Zerfälle/min; 1oo dpm entsprachen im Durchflußzähler 1o, im Szintillationszähler 33 ipm (Impulse/min)

lich. Die Substanz verhielt sich in jeder Beziehung wie zur Kontrolle mitgelaufenes Tyramin, ihre Menge reichte aus, schon im Durchflußzähler einen Aktivitätsgipfel (R_f o.55) zu ergeben.

Die genannten Ergebnisse machen sehr wahrscheinlich, daß N-Acetyl-dopamin auch die Tyrosindecarboxylase von Calliphora in vivo hemmt. Ob diesem Mechanismus große physio-

Tab. 6

A 1: Zählung der Chromatogramme (ipm, Methandurchflußzähler)

Vers. Nr.	Dauer (h)	Tyrosin K	Tyrosin V		Metaboliten K	Metaboliten V
1a	0	19 1oo	19 483			
1b	17	13 775	9 733			
2a	5	12 7oo	11 125		542	9oo
2b	17	9 542	6 942		742	1 o58
3	5	21 45o	18 492	R_f o.55	933	167
				R_f o.6 - 1.o	1 558	1 458
4	5	11 983	9 883		1 633	1 2oo
5	11	1o 716	14 o5o		1 3oo	1 15o
6	11	19 225	25 842		2 358	1 692

A 2: Zählergebnisse der Chromatogramme in % der gesamten injizierten Aktivität (korrigiert um den Ausbeutefaktor des Zählers (ipm x 1o), nicht um Ausbeutefaktor der Aufarbeitung, deren durchschnittliche Ausbeute bei 65 % liegt)

Vers. Nr.	Dauer (h)	Tyrosin K	Tyrosin V		Metaboliten K	Metaboliten V
1a	0	63.7	64.9			
1b	17	45.9	32.5			
2a	5	5o.8	44.5		2.2	3.6
2b	17	38.2	27.8		3.o	4.2
3	5	42.9	37.o	R_f o.55	1.9	o.3
				R_f o.6 - 1.o	3.1	2.9
4	5	34.2	28.2		4.8	3.4
5	11	21.4	28.1		2.6	2.3
6	11	19.2	25.8		2.4	1.7

B: Zählung der Elektrophoresen (ipm, Szintillationszähler)

Vers. Nr.	Tyramin K	Tyramin V	N-Act/N-Acd/G K	N-Act/N-Acd/G V	PCS K	PCS V	NPS K	NPS V
3	29oo	15o	3962	3469	851	1119	123	426
4	162	63	3781	2459	464	572	92	71
5	246	85	4567	3183	887	32o	89	84

Abkürzungen: N-Act = N-Acetyl-tyramin, N-Acd = N-Acetyl-dopamin, G = N-Acetyl-dopamin-glucosid, PCS = Phenolcarbonsäuren (p-Hydroxy-phenylpropionat, -acetat(?), -pyruvat), NPS =nicht phenolische unidentifizierte Säuren mit R_f o.45 bis o.55; K = Kontrolltiere, V = Versuchstiere.

logische Bedeutung zukommt, scheint fraglich, weil Aktivitätsmaximum des Enzyms (5. Tag) und die Zeit der lebhaftesten N-Acetyl-dopamin-Bildung (8. Tag) nicht zusammenfallen.

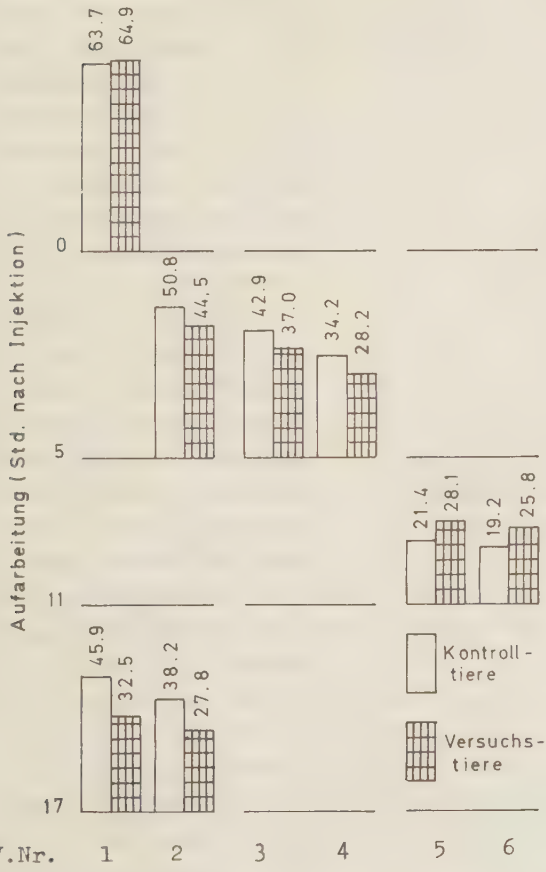


Abb. 19: Wiedergefundenes Tyrosin-U-C 14 nach Injektionen von N-Acetyl-dopamin in 4- (Versuch 1 - 4) und 5-tägige (Versuch 5,6) Larven. Ausbeute der Methode durchschnittlich 65 %.

Im Gegensatz zum eben beschriebenen Ergebnis war das zweite auffällige Resultat der Versuche, das raschere Verschwinden des Tyrosins aus den 4-tägigen Versuchstieren (Versuch 1 - 4) nicht konstant. Bei 5-tägigen Tieren (Versuch 5 und 6) verschwand Tyrosin schneller aus den Kontrolltieren (Abb.19).

Wegen des nicht genau synchronisierten physiologischen Alters der Larven lassen sich nur Kontroll- und Versuchstiere des jeweils gleichen Versuchs direkt vergleichen. Das Ergebnis der zur Kontrolle bei Versuch 1 kurz nach den Injektionen vorgenom-

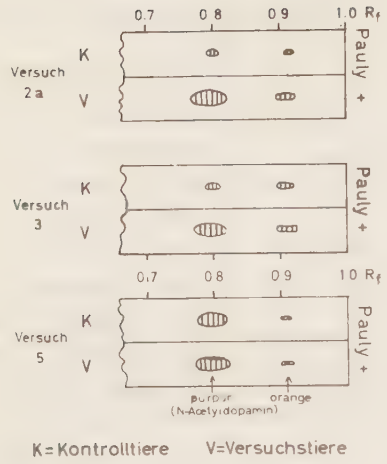


Abb. 2o: Farbreaktionen der Erstchromatogramme mit diazotierter Sulfanilsäure (Paulys Reagens). Versuch 2a + 3 = 4-tägige Tiere (Versuch 1 + 4 : selbe Färbung); Versuch 5 = 5-tägige Tiere (Versuch 6 : selbe Färbung)

menen Aufarbeitung (Versuch 1a) und die in Tab. 4 (S.32) dargestellten Resultate, die mit der gleichen Aufarbeitungsmethode gewonnen wurden (bei zusammengehörigen Kontroll- und Versuchstieren wurden je etwa gleiche Aktivitätsmengen wiedergefunden), sprechen gegen eine technische Ursache der Unterschiede.

Die Inkonstanz der Resultate bei nur um einen Tag älteren Tieren läßt Zweifel an der Signifikanz der Werte bestehen, obwohl diese Tiere ihren Tyrosinstoffwechsel bereits teilweise umgesteuert hatten und sich daher von den 4-tägigen Larven deutlich unterschieden (Abb. 2o): am Ende der Versuche war hier der purpurne Fleck bei R_f o.8 (ein grobquantitatives Maß für den N-Acetyl-dopamin-Gehalt der Tiere) bei Kontroll- und Versuchstieren fast gleich kräftig, obwohl letztere eine größere Menge der Substanz injiziert bekommen hatten.

Wenn man Signifikanz der Unterschiede voraussetzt, kommen verschiedene Erklärungen in Frage, die nur kurz erwähnt seien. Da Tyrosin in den Versuchstieren offenbar langsamer in Tyramin und N-Acetyl-Verbindungen umgewandelt wird, muß es in den Versuchstieren von Versuch 1 - 4 rascher transaminiert oder ausgeschieden worden sein.

N-Acetyl-dopamin könnte einmal die Neusynthese der Tyrosin-

transaminase stimulieren oder, durch einen allosterischen Effekt (92), die Aktivität des Enzyms steigern und dadurch eine raschere Transaminierung bewirken.

Wahrscheinlicher scheint eine Vergiftung der Versuchstiere mit N-Acetyl-dopamin, die als Sekundärwirkung eine gesteigerte Transaminierung oder Ausscheidung von Tyrosin hervorruft. Noch höhere Dosen N-Acetyl-dopamin als in Versuch 1 (200 γ/ Tier, etwas über 10^{-2} mMol / g Lebendgewicht) töten 4-tägige Tiere in wenigen Stunden.

Die Versuche erlauben keine schlüssige Deutung; weitere Untersuchungen müssen klären, ob die Resultate signifikant sind und, wenn ja, wie sie und besonders die unterschiedlichen Ergebnisse bei 4- und 5-tägigen Tieren zustande kommen.

3. Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Dopadecarboxylase von Calliphora erythrocephala

Die Dopadecarboxylase von Calliphora ist wie entsprechende Säugerenzyme (105, 109) von Pyridoxalphosphat als Cofaktor abhängig; zur Wiederherstellung voller Aktivität müssen den Präparationen (vergl. exper. Teil) außerdem Eisenionen (Fe^{++} oder Fe^{+++}) zugegeben werden (113).

a) Zur Spezifität der Wirkung des N-Acetyl-dopamins

Es wurde oben (S.30 ff) gezeigt, daß N-Acetyl-dopamin die Dopadecarboxylase von Calliphora in vivo hemmt. Wie erwähnt hatte SEKERIS (113) diese Hemmung in vitro nachgewiesen. Er fand außerdem, daß Dopamin kaum und N-Acetyl-dopa erheblich weniger als N-Acetyl-dopamin wirkten, womit eine spezifische Wirkung des N-Acetyl-dopamins bereits sehr wahrscheinlich geworden war (Tab. 7). α-Methyl-dopa hemmte das Enzym ebenfalls schwächer als N-Acetyl-dopamin.

Eigene Ansätze mit Enzympräparaten, die durch fraktio-

nierte Fällung mit Ammoniumsulfat und Gelfiltration an Sephadex angereichert waren, zeigten, daß N-Acetyl-tyramin ebenfalls erheblich schwächer als N-Acetyl-dopamin wirkte (Tab. 8, Tests 9 und 11 - 14).

Leichte Abwandlungen des N-Acetyl-dopamin-Moleküls, wie das Fehlen der Acetyl-Gruppe (Dopamin), einer OH-Gruppe (N-Acetyl-tyramin) oder eine zusätzliche COOH-Gruppe (N-Acetyl-dopa), verringern also die Wirksamkeit deutlich.

Ein Einwand gegen die Spezifität der Wirkung bestand darin, daß N-Acetyl-dopamin als Diphenol sehr leicht zum Chinon oxydiert werden kann. Chinone und (nach Oxydation) potentielle Chinone können durch Reaktionen mit SH- und NH_2-Gruppen von Proteinen Enzyme unspezifisch hemmen (19 b).

Zum Ausschluß dieser Möglichkeit wurden einigen Ansätzen Cystein und Glutathion als Reduktionsmittel zugesetzt. Die Versuche (Tab. 8, Tests 7 - 10) zeigten, daß eine Chinonwirkung, wenn überhaupt, nur einen sehr geringen Teil der Hemmwirkung des N-Acetyl-dopamins ausmachen kann. $0.9 \cdot 10^{-3}$ Mol / l N-Acetyl-dopamin verminderte die Decarboxylase-Aktivität beim Ansatz ohne Reduktionsmittel um 25 % gegenüber dem Kontrollansatz (Test 9 gegen 10), beim Ansatz mit Reduktionsmitteln sogar um über 40 % (relative Aktivität 90 % bei Test 7 gegenüber 154 % bei Test 8).

Die zusätzliche Aktivierung des Enzyms durch die Reduktionsmittel war überraschend. Sie wurde durch Cystein verursacht, während Glutathion keinen signifikanten Einfluß auf das Enzym hatte (Tests 22 - 25). Eine sichere Erklärung dieses Phänomens konnte nicht gefunden werden. Es wäre denkbar, daß im Lauf der Präparation oxydierte SH-Gruppen des Proteins durch Cystein wieder reduziert wurden; daß Glutathion wirkungslos blieb, ließ an dieser Annahme zweifeln. An einen allosterischen Effekt (92) wurde gedacht, wobei aber die physiologische Bedeutung des Effektes unklar blieb. HARTMAN et al. (46) fanden bei

Tab. 7

Hemmbarkeit der Dopadecarboxylase in vitro (nach SEKERIS, 1113). Versuchsbedingungen: 66 mU Enzym (Rohhomogenat), Substrat: Dopa. Meßmethode: Radiochemischer Test.

Inhibitor	Konzentration (Mol/l)	% Hemmung
N-Acetyl-dopamin	1.7×10^{-3}	35
α-Methyl-dopa	1.7×10^{-3}	24
N-Acetyl-dopa	1.7×10^{-3}	24
Dopamin	2.1×10^{-3}	5

Tab. 8

Hemmbarkeit der Dopadecarboxylase in vitro (eigene Ergebnisse). Enzym durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat und Gelfiltration an Sephadex G 50 angereichert. Substrat: L-Dopa. Meßmethode: Radiochemischer Test. Volumen der Ansätze (ml): Tests 1 - 6 = 3.5, Tests 7 - 17 = 3.7, Tests 18 - 25 = 3.6.

a) 50 mU Enzym; 1.41×10^{-3} Mol / l L-Dopa; Inkubationsdauer = 45 min; Zusätze wie angegeben (Konz. in Mol / l).

Nr.	Fe^{+++}	PAL-P	Zusätze	Konz.	% Hemmg
1	$0.28 \cdot 10^{-4}$	$0.28 \cdot 10^{-4}$	0	0	0
2	0	0	0	0	68
3	$0.28 \cdot 10^{-4}$	$0.28 \cdot 10^{-4}$	p-Hydroxyphenyl-brenztraubensäure	$1.8 \cdot 10^{-4}$	18
4a	"	$0.28 \cdot 10^{-3}$	p-Hydroxyphenyl-brenztraubensäure	$2.3 \cdot 10^{-4}$	17
4b	"	"	"	"	21
5a	"	$0.28 \cdot 10^{-4}$	Phenylbrenztraubensäure	$2.0 \cdot 10^{-4}$	25
5b	"	"	"	"	35
6a	"	$0.28 \cdot 10^{-3}$	α-Keto-isovaleriansäure	$1.4 \cdot 10^{-4}$	14
6b	"	"	"	"	18

Tab. 8

b) 84 mU Enzym; $1.37 \cdot 10^{-3}$ Mol / l L-Dopa; $1.7 \cdot 10^{-4}$ M / l Fe^{+++}; $4.1 \cdot 10^{-4}$ M / l PAL-P; Zusätze wie angegeben (in Mol / l). Inkubationszeit 15 min.

Nr.	Zusätze	Konzentration	% Aktivität	% Hemmung
7	N-Acetyl-dopamin Glutathion Cystein	$0.9 \cdot 10^{-3}$ $2.6 \cdot 10^{-3}$ $1.1 \cdot 10^{-3}$	90	10
8	Glutathion Cystein	$2.6 \cdot 10^{-3}$ $1.1 \cdot 10^{-3}$	154	- 54
9	N-Acetyl-dopamin	$0.9 \cdot 10^{-3}$	75	25
10	Ø (Kontrolle)	-	100	0
11	N-Acetyl-tyramin	$7.5 \cdot 10^{-3}$	78	22
12	"	$1.5 \cdot 10^{-3}$	88	12
13	"	$0.3 \cdot 10^{-3}$	98	2
14	Ø (Kontrolle)	-	100	0
15	α-Keto-isovaleri-ansäure	$8.4 \cdot 10^{-3}$	67	33
16	"	$1.7 \cdot 10^{-3}$	83	17
17	"	$0.3 \cdot 10^{-3}$	91	9

) 13 mU Enzym; $1.41 \cdot 10^{-3}$ Mol / l L-Dopa; $1.7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Fe^{+++} ; $3.4 \cdot 10^{-4}$ M / l PAL-P; Zusätze wie angegeben(in Mol / l). Inkubationszeit 15 min.

18	α-Keto-isocap-ronsäure	10^{-2}	51	49
19	"	$2.1 \cdot 10^{-3}$	79	21
20	"	$0.4 \cdot 10^{-3}$	90	10
21	Ø (Kontrolle)	-	100	0
22	Cystein	$4.8 \cdot 10^{-3}$	205	- 105
23	"	$0.9 \cdot 10^{-3}$	123	- 23
24	Glutathion	$4.5 \cdot 10^{-3}$	108	- 8
25	"	$0.9 \cdot 10^{-3}$	97	3

einem Enzym aus Schweineniere keinen solchen Effekt von Cystein und Glutathion.

Zum Ausschluß einer Komplexbildung zwischen N-Acetyl-dopamin und Pyridoxalphosphat wurden beide Substanzen in vitro zusammen inkubiert (S.51, Abb. 24). Wie erwartet, fanden sich keine Zeichen einer Komplexbildung.

N-Acetyl-dopamin greift also am Enzym selber an; die Hemmung ist spezifisch.

b) Wirkung einiger aromatischer und nichtaromatischer α-Ketosäuren

Die bei der Phenylketonurie in Blut und Urin der Patienten auftretenden α-Ketosäuren Phenylbrenztraubensäure (32) p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure (1o) hemmen Dopadecarboxylasen von Säugern (11, 46, 31); es scheint, daß diese Wirkung einen wesentlichen pathogenetischen Faktor für die bei diesen Patienten festgestellten erniedrigten Catecholaminspiegel im Blut (93,13o) darstellt. In einem Modellversuch an Stücken von Meerschweinchen-Nebennierenmark konnten BOYLEN und QUASTEL (11) nachweisen , daß Phenylpyruvat die Dopadecarboxylase bereits in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol / l zu 97 % hemmt; die maximalen Konzentrationen der pathologischen Metaboliten liegen nach HUANG und HSIA (5o) bei $3.3 \cdot 10^{-3}$ Mol / l. JERVIS fand allerdings bei 39 Patienten für Phenylpyruvat allein nur einen durchschnittlichen Plasmagehalt von $4.3 \pm 1.5 \cdot 10^{-5}$ Mol / l (54), BOYLEN und QUASTEL fanden aber bei ihren Versuchen auch durch Zugabe von nur $5 \cdot 10^{-5}$ Mol / l Phenylpyruvat schon eine 33 %-ige Hemmung des Enzyms (11).

Bei der Leucinose (Maple syrup urine disease) treten im Urin (123 a) und, in Gesamtkonzentrationen bis zu $2 \cdot 10^{-3}$ Mol / l (28), im Plasma die α-Keto-Analogen des Leucin ,

Isoleucin und Valin auf, da die Decarboxylase für diese Verbindungen nicht funktionsfähig ist (27). Diese α-Ketosäuren hemmen in vitro die Glutaminsäuredecarboxylase aus Rattengehirn-Homogenaten und - schwächer - aus E.coli (TASHIAN, 125); dieses Enzym katalysiert die Synthese von γ-Aminobuttersäure (Gaba), einer wahrscheinlich im Gehirn als Überträgersubstanz fungierenden Verbindung, und wird in vitro auch durch die aromatischen α-Ketosäuren Phenylbrenztraubensäure und p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure gehemmt (TASHIAN, 125; HANSON, 45). Der umgekehrte Versuch, ob aliphatische α-Ketosäuren auch eine Decarboxylase aromatischer Aminosäuren hemmen können, ist meines Wissens bisher nicht gemacht worden.

Deshalb sollten beide Arten von α-Ketosäuren an der Dopadecarboxylase von Calliphora getestet werden, die aromatischen, um festzustellen, ob sich das Calliphoraenzym ähnlich wie die Säugerenzyme verhält, die aliphatischen, um zu klären, ob sie überhaupt einen Einfluß haben.

Alle geprüften Verbindungen senkten bei in vitro-Versuchen die Enzymaktivität, wenn auch verschieden stark. Unter Berücksichtigung der verwendeten Inhibitorkonzentrationen wirkte Phenylbrenztraubensäure (Tab. 8, Test 5) stärker als die p-Hydroxy-Verbindung (Tests 3 - 4); α-Keto-isovaleriansäure, das Transaminierungsprodukt des Valins (Tests 6, 15 - 17) wirkte unter Berücksichtigung der verschiedenen eingesetzten Enzymmengen stärker als der analoge Leucinabkömmling α-Keto-isocapronsäure (Tests 18 - 2o). Die aromatischen Verbindungen wirkten erheblich stärker als die aliphatischen; bei der Glutaminsäuredecarboxylase aus Rattengehirn (125) verhielt sich dies umgekehrt.

Es wurde versucht, mit Phenylbrenztraubensäure auch Versuche in vivo durchzuführen. Da sich diese Substanz in für Injektionen brauchbaren Lösungsmitteln zu schlecht löste, wurde stattdessen ein Versuch mit p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure unternommen. Da mehrmals eine Überwindung von

Tab. 9

Versuchsbedingungen zum Versuch mit p-Hydroxy-phenyl - brenztraubensäure und Pyridoxal-Phosphat (PAL-P) an weissen Vorpuppen in vivo:

Gewicht der Tiere: 62 mg; Injektionsvolumen lo µl / Tier; Konzentrationen in mMol / g Lebendgewicht; Versuchsdauer = 65 min; Meßmethode : Radiochemischer Test.

Nr.	PAL-P	pHPBTS	In % der wiedergefund. Aktivität Dopa	X	Dopa + X	Metabol.
1	-	-	73.9	-	73.9	26.1
2	$1.1 \cdot 10^{-2}$	-	9.8	81.9	91.7	8.3
3	-	$2.1 \cdot 10^{-3}$	8o.6	-	8o.6	19.4
4	$1.7 \cdot 10^{-4}$	"	68.9	8.o	76.9	23.1
5	$1.1 \cdot 10^{-3}$	"	24.3	4o.1	64.4	35.6
6	$5.3 \cdot 10^{-3}$	"	12.8	81.3	94.1	5.9
7	$1.1 \cdot 10^{-2}$	"	9.5	86.5	96.o	4.o

Abkürzungen: PAL-P Pyridoxalphosphat
pHPBTS p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure
Metabol. Metaboliten (Dopamin + N-Acetyl-dopamin + N-Acetyl-dopamin-glucosid)

Hemmeffekten auf Decarboxylasen aromatischer Aminosäuren aus Säugern oder eine zusätzliche Aktivierung dieser Enzyme durch Zugabe von Pyridoxal-Phosphat (PAL-P) beschrieben wurde (AWAPARA et al., 6; HUANG et al., 5o; SCHOTT et al., 1o9), wurde den Injektionslösungen neben 1o ooo dpm DL-Dopa-2'-C 14 / Tier auch PAL-P in verschiedenen Konzentrationen zugefügt (Versuchsbedingungen und Ergebnisse s. Tab. 9).

Die bei R_f o.15 auf Chromatogrammen aus Versuch 2 und 4 - 7 auftretende Substanz ist ein Komplex aus Dopa und PAL-P (vergl. S. 48). Wenn man also X zum unverwandelten Dopa rechnet (Tab. 9, vorletzte senkrechte Spalte), zeigt sich erstens ein deutlicher Hemmeffekt der p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure (Versuch 3 gegen V 1, V 7 gegen V 2) , zweitens bis zu einer Konzentration von ca 10^{-3}mMol / g Lebendgewicht eine deutliche Aktivierung des Enzyms durch

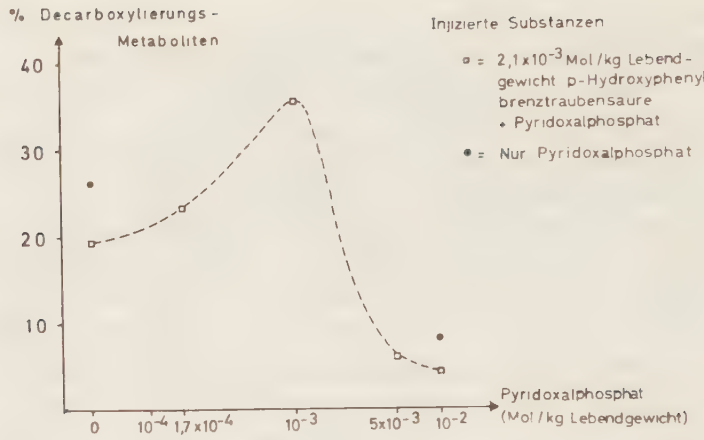


Abb. 21: Injektionen von p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, PAL-P und Dopa-2'-C 14 in weiße Vorpuppen

PAL-P, die diese Hemmung mehr als ausgleicht (Abb. 21). In noch höheren Konzentrationen hemmt PAL-P selber, was durch die Zunahme der Bildung des Komplexes aus PAL-P und Dopa zustande kommt. Daß PAL-P im Überschuß (allerdings nicht in extremen Konzentrationen) das Enzym zu aktivieren vermag, stellt eine weitere Parallele zwischen Calliphora- und Säugerenzymen dar.

Der Effekt trat in vitro nicht auf (Tab. 8, Test 3 und 4, mit verschiedenen PAL-P-Konzentrationen), während ihn AWA-PARA et al. bei einem Enzym aus Rattenleber in vitro erhalten hatten (6).

c) Komplexbildung des Pyridoxalphosphats

Es wurden zunächst Ansätze mit inaktivem L-Dopa und mit DL-Dopa-2'-C 14 durchgeführt, und die Lösungen nach den angegebenen Zeiten (Tab. 1o A, B) spektroskopisch (inaktive Ansätze) oder papierchromatographisch (radioaktive Ansätze) untersucht (Abb. 22, 23).

Tab. 1o

Inkubationen von Pyridoxalphosphat mit verschiedenen Substanzen. Für alle Ansätze gültige Bedingungen:

In 3 ml o.oo67 m Phosphatpuffer pH 6.95
Inkubation im Dunkeln bei 2o ° C
Alle Substanzen (außer DL-Dopa-2'-C 14) in einer Konzentration von 2.5 • $1o^{-4}$ Mol / l

A. PAL-P + L-Dopa:

Ansatz a) PAL-P (Kontrolle I)
" b) L-Dopa (Kontrolle II)
" c) PAL-P + L-Dopa

Spektren von sämtlichen Ansätzen aufgenommen nach:
1. 3o min 2. 3 h 3. 19 h

B. PAL-P + DL-Dopa-2'-C 14:

Ansatz a) 2oo ooo dpm DL-Dopa-2'-C 14
" b) 2oo ooo dpm DL-Dopa-2'-C 14 + PAL-P

Papierchromatogramme beider Ansätze angefertigt nach 6 h

C. PAL-P + N-Acetyl-dopamin:

Ansatz a) PAL-P (Kontrolle I)
" b) N-Acetyl-dopamin (Kontrolle II)
" c) PAL-P + N-Acetyl-dopamin

Spektren von sämtlichen Ansätzen aufgenommen nach:
1. 3o min 2. 24 h

Als Zeichen einer Komplexbildung erhöhte sich das Maximum bei 327 mμ, während das Maximum bei 388 mμ nach 3o Minuten teilweise, nach 19 Stunden völlig verschwunden war; der isosbestische Punkt lag bei 345 mμ. Die Resultate stimmten mit den bereits 1952 von SCHOTT und CLARK (1o9) beschriebenen überein; dort war - der einzige Unterschied - bei 37 ° C und pH 6.8 inkubiert worden, während hier bei 2o° C und pH 6.95 gearbeitet wurde. Die Temperatur entsprach den Verhältnissen in vivo (die Tiere wurden nach Injektionen bei 2o° im Brutschrank gehalten).

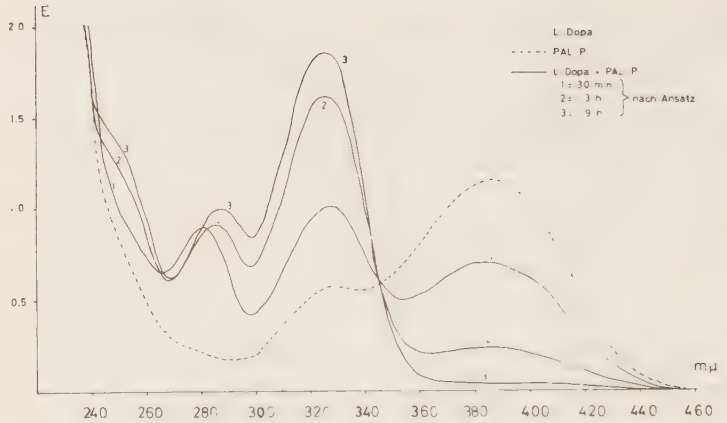
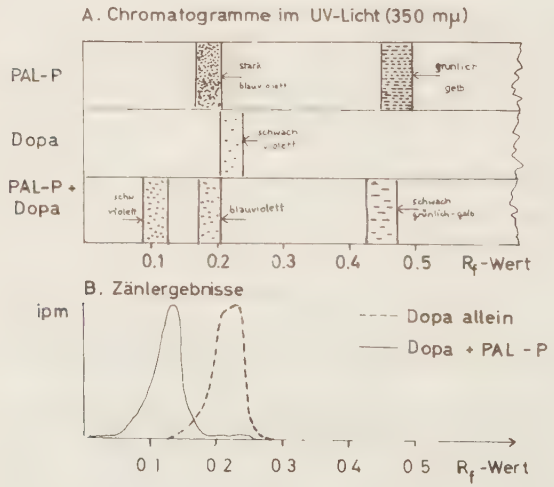


Abb. 22: Spektren von Dopa, PAL-P und gemeinsamem Ansatz beider Verbindungen bei pH 6.95

Abb. 23: Ergebnisse von Chromatogrammen mit DL-Dopa-2-C 14, PAL-P und gemeinsamem Ansatz beider Verbindungen bei pH 6.95 (im Radiopapierchromatographen - B, unter UV-Lampe - A)



Beim Ansatz mit radioaktivem Dopa (Abb. 23) fand sich die Aktivität nicht mehr bei R_f o.2 - o.25 (Dopa), sondern bei R_f o.15 (= R_f von X, s.S.47). UV-Beleuchtung der Chromatogramme zeigte, daß die gelbliche PAL-P-Bande bei R_f o.45 nach Zugabe von Dopa abgeschwächt, die Bande von Dopa bei R_f o.22 nach Zugabe von PAL-P verschwunden war. Die schwache blauviolette Bande bei R_f o.19 auf dem 1. und 3. Chromatogramm entsprach offenbar einer Verunreinigung oder einem Degradationsprodukt des PAL-P.

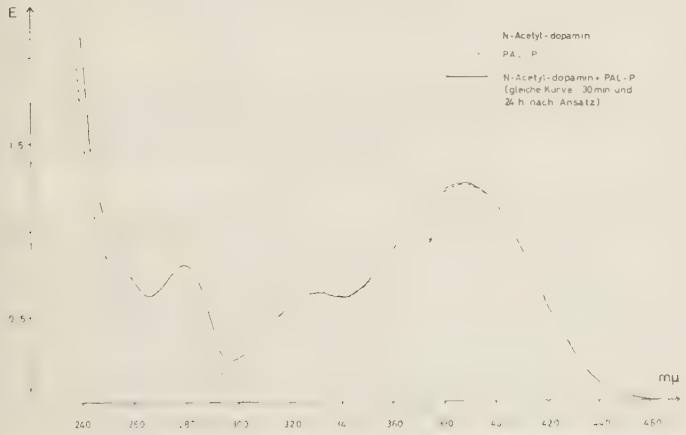


Abb. 24: Spektrum von N-Acetyl-dopamin, PAL-P und gemeinsamem Ansatz beider Verbindungen bei pH 6.95

Solche Komplexe wurden auch für Kombinationen aus 5-Hydroxy-tryptophan (6), Histidin, Histamin, Phenylalanin- und Phenäthylamin-Derivaten (1o9) mit PAL-P in vitro beschrieben.

Die Struktur von N-Acetyl-dopamin, die keine freie Aminogruppe enthält, schien eine Komplexbildung mit PAL-P auszuschließen; sicherheitshalber wurden trotzdem auch N-Acetyl-dopamin und PAL-P zusammen inkubiert (Tab. 1o C). Es bildete sich kein Komplex, das Spektrum des Ansatzes war nach 24 h unverändert (Abb. 24).

C . D I S K U S S I O N

Die geschilderten experimentellen Befunde liefern Beiträge zu zwei Gebieten:

1. Regulation des Tyrosinstoffwechsels bei Insekten.
2. Vergleich zwischen Dopadecarboxylasen aus Insekten und Säugern; Hemmbarkeit dieser Enzyme durch pathologische Metaboliten.

Zu 1: Aus vielen Versuchen, vor allem an Bakterienenzymsystemen, ließen sich zwei typische Strukturregeln für rasch arbeitende Regelkreise des Stoffwechsels ableiten, die, offenbar weil besonders ökonomisch, im Lauf der Evolution häufig verwirklicht wurden:

1. Nicht das Produkt eines Enzyms, sondern das Endprodukt eines Stoffwechselweges reguliert. Dieses greift
2. an dem Enzym an, das am Eingang zu diesem Stoffwechselweg steht, dem Schlüsselenzym (92).

Die längerfristige Regulation des Stoffwechsels wird andererseits in vielen Fällen durch eine Kontrolle der Synthese von Enzymen bewerkstelligt. Bei Bakterien induziert oft die Ausgangssubstanz eines Stoffwechselweges die Synthese der für diesen Weg benötigten Enzyme (MONOD, 91); bei höheren Tieren bewirken häufig Hormone die Synthese von Enzymen, die zu einer Umschaltung von einem in einen anderen Gleichgewichtszustand gebraucht werden (CLEVER und KARLSON, 2o; 57, 58). Ein Beispiel wurde schon mehrmals erwähnt: Cortisol stimuliert in der Säugerleber die Synthese der Schlüsselenzyme des katabolischen Tyrosin- und Tryptophanstoffwechsels, Tyrosintransaminase und Tryptophanpyrrolase (3o, 69, 7o, 77). Differenzierungsprozesse und Metamorphose sind ähnliche Gleichgewichtsumschaltungen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung von Organismen auftreten. Im Sinn einer sicheren und möglichst einfachen Regulation ist zu erwarten, daß dabei im allgemeinen nur die Synthese von Schlüsselenzymen induziert wird.

Am Tyrosinstoffwechsel von Calliphora lassen sich die beschriebenen Regeln ausgezeichnet belegen. Abb. 25 und Tab. 11 fassen die wesentlichen Schritte und Enzyme zusammen. Von der

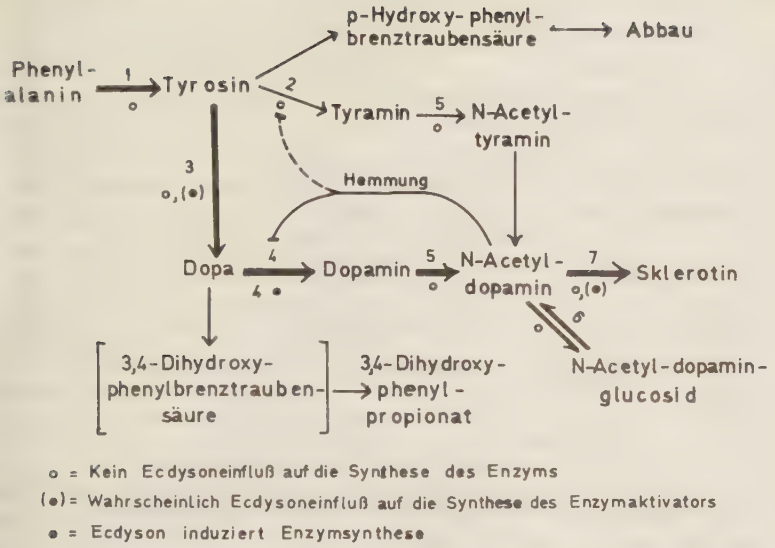


Abb. 25: Regulation der Biosynthese des N-Acetyl-dopamins

für Calliphora essentiellen Aminosäure Phenylalanin zur Sklerotisierungssubstanz N-Acetyl-dopamin führen 4 enzymatische Schritte, das Glucosid bildet einen Nebenschluß. Der Weg verzweigt sich bei Tyrosin und Dopa; nach der letzten Verzweigung greift die Dopadecarboxylase ein, sie ist das Schlüsselenzym. Tatsächlich stellt sie das einzige Enzym der Kette dar, dessen Synthese von Ecdyson induziert wird (64, 119).Die Diphenoloxydase (Enzym 7, wahrscheinlich mit der Monophenoloxydase identisch - 61), steht am Beginn des eigentlichen Sklerotisierungsprozesses, ist also ebenfalls eine Art Schlüsselenzym. Ein Ecdysoneinfluß auf die Synthese des ihr zugehörigen Aktivators ist wahrscheinlich (62, 121). Daß Ecdyson auf die Synthese von zwei der anderen Enzyme (Phenylalanin - hydroxylase und glucosidbildendes System)keinen direkten Einfluß hat, wurde in dieser Arbeit gezeigt.

Auf der unteren Regulationsebene vermag N-Acetyl-dopamin als Endprodukt das Schlüsselenzym seiner Synthese zu hemmen. Hier wurde dies auch in vivo gezeigt, außerdem wurde gezeigt, daß der Effekt spezifisch ist.

Tab. 11: Einfluß des Ecdysons auf den Sklerotisierungsstoffwechsel von Calliphora

Nr. in Abb. 25	Enzym	Direkter Ecdysoneinfluß auf Enzymsynthese	Quelle
1	Phenylalaninhydroxylase	nein	(f)
2	Tyrosindecarboxylase	nein (§)	
3	Monophenoloxydase " , Aktivatorenzym	nein (§§) wahrscheinlich	(a,e)
4	Dopadecarboxylase	ja	(b,d)
5	Transacetylierendes System	nein	(c)
6	Glucosidbildendes System	nein	(f)
7	Diphenoloxydase " , Aktivatorenzym	nein (§§) wahrscheinlich	(a,e)

(§) : nicht speziell untersucht; höchste Enzymaktivität 5.Tag
(§§): die Enzyme 3 und 7 sind wahrscheinlich identisch (9).

Quellen: (a) KARLSON und SCHWEIGER 1961 (62)
(b) KARLSON und SEKERIS 1962 (64)
(c) KARLSON und AMMON 1963 (59)
(d) SEKERIS und LANG 1964 (119)
(e) SHAAYA und SEKERIS 1965 (121)
(f) diese Arbeit

Schließlich wurde wahrscheinlich gemacht, daß N-Acetyl-dopamin auch das andere Schlüsselenzym seiner Synthese zu hemmen vermag: die Tyrosindecarboxylase. Der zweiten Wirkung dürfte allerdings bei Calliphora wenig physiologische Bedeutung zukommen, da das Enzym vor der Verpuppung, wenn in den Larven viel N-Acetyl-dopamin vorhanden ist, keine bedeutende Rolle mehr spielt. In jüngeren Tieren werden auf diesem Weg nur relativ geringe Mengen N-Acetyl-dopamin gebildet, die keine starke Hemmung hervorrufen dürften.

Zu 2: Tab. 12 vergleicht den in dieser Arbeit festgestellten Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Dopadecarboxylase von Calliphora mit deren Wirkungen auf Dopadecarboxylasen von Säugern, soweit diese bekannt sind. Der Vollständigkeit halber wurden einige der 1962 von SEKERIS erhaltenen Resultate eingefügt (113).

Tab. 12

SUBSTANZ oder PARAMETER	SÄUGER-DOPA-DECARBOXYLASEN	CALLIPHORA - DOPA - DECARBOXYLASE
pH-Optimum	7.2 (d) 6.8, 6.8 (a)	6.8 (f)
Relative Aktivität gegenüber L-Dopa DL-5-OH-Tryptophan p-Tyrosin	6400 1.81 1000 0.40(d) 34(e)	34 4.5 unter 0.05 (f)
Pyridoxalphosphat im Überschuß	stimuliert (d)	stimuliert (g)
Hemmung durch α-Methyl-dopa	37 % bei K_I = 2 x 10^{-4} Mol/l (b)	24 % bei K_I = 1.7 x 10^{-3} Mol/l (f)
Hemmung durch Phenylbrenztraubensäure	60 %, K_I = 2 x 10^{-3} Mol/l (b) 97 %, K_I = 5 x 10^{-4} Mol/l (c)	30 %, K_I = 2 x 10^{-4} Mol/l (g)
Hemmung durch p-OH-phenylbrenztraubensäure	60 %, K_I = 2 x 10^{-3} Mol/l (b)	ca 20 %, K_I = 2 x 10^{-4} Mol/l (g)
Hemmung durch α-Keto-isocapronsäure	?	21%, K_i = 2 x 10^{-3} 49%, K_I = 10^{-2} Mol/l (g)
Hemmung durch α-Keto-isovaleriansäure	?	17%, K_I = 1.7 x 10^{-3} 33%, K_I = 8.4 x 10^{-3} Mol/l (g)
Glutathion	wirkungslos (b)	wirkungslos (g)
Cystein	wirkungslos (b)	stimuliert (g)
Hemmung durch N-Acetyl-dopamin	?	in vitro (f) und in vivo (g)
N-Acetyl-tyramin	?	hemmt schwach (g)

Angegebene Quellen und - bei Säugerenzymen - benutzte Spezies:

(a) SCHALES und SCHALES 1949 (105), Meerschweinchen- und Kaninchen-Niere
(b) HARTMAN, AKAWIE und CLARK 1955 (46), Schweine-Nierenrinde
(c) BOYLEN und QUASTEL 1961 (11), Meerschweinchen-Nebennierenmark
(d) AWAPARA, SANDMAN und HANDY 1962 (6), Rattenleber
(e) LOVENBERG, WEISSBACH und UDENFRIEND 1962 (80), aus Meerschweinchen-Niere und (mit 1/40 der angegebenen absoluten Aktivitäten) Hundehirnstamm
(f) SEKERIS 1963 (113)
(g) eigene Ergebnisse

Die Aufstellung zeigt, daß Calliphora- und Säugerenzyme in fast allen Fällen, wo ein Vergleich möglich ist, sich ähnlich verhalten. Eine Ausnahme bildet die Stimulierung des Calliphoraenzyms durch Cystein, für die keine schlüssige Erklärung gegeben werden kann. Unter Berücksichtigung der verschiedenen benutzten Inhibitorkonzentrationen hemmen p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure und Phenylbrenztraubensäure beide Enzyme etwa gleich stark. α-Methyl-dopa hemmt allerdings ein Enzym aus Schweineniere deutlich stärker als das Calliphoraenzym. Das Calliphoraenzym besitzt außerdem eine etwas schwächere relative Aktivität gegenüber 5-Hydroxy-tryptophan und p-Tyrosin als die untersuchten Säugerenzyme; in diesem Zusammenhang scheint wichtig, daß Calliphora offenbar über eine spezielle 5-Hydroxy-tryptophan-Decarboxylase verfügt (81).

Ob die Dopadecarboxylasen von Insekten und Säugern, die sich in vielen Punkten ähnlich verhalten, analoge oder homologe Resultate der Evolution darstellen, läßt sich ohne Kenntnis ihrer Aminosäurensequenz nicht beurteilen.

Die Hemmung einer Dopadecarboxylase durch aliphatische α-Ketosäuren ist meines Wissens bisher nicht beschrieben worden. Dieses Resultat könnte unter Umständen eine Bedeutung für die Pathogenese der Leucinose haben, bei der diese Verbindungen sich im Organismus anhäufen.

Es ist meines Wissens bisher nicht bekannt, ob bei der Leucinose die Catecholamine (Noradrenalin und Adrenalin) im Serum der Patienten vermindert sind. Bei der Phenylketonurie ist dies mehrfach beschrieben worden (93, 130), die Versuche von FELLMAN (31) und BOYLEN und QUASTEL (11) machen wahrscheinlich, daß eine Hemmung der Dopadecarboxylase durch Phenylbrenztraubensäure ätiologisch beteiligt ist. Neuere Versuche von NAGATSU und TAKEUCHI (95) sowie IKEDA et al. (52) deuten an, daß auch eine Hemmung der Tyrosinhydroxylase durch Phenylalanin beteiligt ist.

Obwohl bei der sonstigen Ähnlichkeit im Verhalten der Dopadecarboxylasen aus Säugern und Calliphora wahrscheinlich ist, daß aliphatische α-Ketosäuren auch die Säugerenzyme hemmen ,

ist zumindest beim Calliphoraenzym ihr Effekt zu schwach,um daraus auf einen ähnlichen Mechanismus bei der Leucinose zu schließen, wie er von der Phenylketonurie her bekannt ist. Konzentrationen von etwa $2 \cdot 10^{-3}$ Mol / l, die den maximalen Plasmakonzentrationen dieser Verbindungen bei Leucinose entsprechen (28), bewirken nur eine etwa 20 %-ige Hemmung des Enzyms. Es wäre aber lohnend, dieser Frage nachzugehen:

Der gefährlichste Defekt, den beide Erkrankungen hervorrufen, ist wohl die Störung der Myelinisierung im Gehirn, die besonders stammesgeschichtlich jüngere Hirnteile betrifft (24, 2). Bei der Leucinose sind im Stirnhirn die Gesamtlipide, besonders aber die Cerebroside (Galactoside, Bausteine des Myelin) deutlich vermindert (101). Das Gleiche gilt für die γ-Aminobuttersäure (Gaba); in diesem Zusammenhang sei an die Ergebnisse von TASHIAN (125) erinnert, der eine Hemmung von Glutaminsäuredecarboxylasen sowohl durch aliphatische,bei der Leucinose auftretende, als auch aromatische, bei Phenylketonurie vermehrte, α-Ketosäuren nachwies (S.46). Bei der Phenylketonurie läßt sich im Gehirn ebenfalls eine Verminderung bestimmter Galactoside (Kerasincerebroside und Kerasinsulfatide) zeigen (MENKES, 83).

Die Frage, wie diese Störungen im Gehirnstoffwechsel entstehen, ist offen. Es ist wahrscheinlich, daß mindestens bei der Phenylketonurie eine Aminosäurentransportstörung eine wichtige Rolle spielt (LINNEWEH und EHRLICH, 78; 44). Es ist noch unklar, welche Bedeutung in diesem Zusammenhang dem Pyridoxyliden-β-phenäthylamin zukommt, einem im Tierversuch neurotoxischen gemeinsamen Metaboliten des Pyridoxins und Phenylalanins, der im Urin von Phenylketonurikern, aber nicht in normalem Urin vorkommt (LOO, 79). Pyridoxalphosphat, Abkömmling des Pyridoxins, spielt eine wesentliche Rolle beim Transport von Aminosäuren durch Zellmembranen (19 a). Auch bei der Leucinose kann diese Störung mitspielen, denn aliphatische Aminosäuren können die Aufnahme anderer Aminosäuren ins Gehirn hemmen(44).

In eine andere Richtung weisen die Ergebnisse von MKHEYAN:

Subkutane Injektionen von (allerdings unphysiologisch hohen Dosen) Adrenalin rufen nach 6 - 12 Stunden eine signifikante Zunahme der Cerebroside in Rattengehirnen hervor (90).

Solange allerdings die Wirkung der α-Keto-Analogen des Leucin, Isoleucin und Valin auf Säugerdopadecarboxylasen und der Catecholaminhaushalt bei Leucinose nicht näher bekannt sind, ist eine mögliche Bedeutung der geschilderten Ergebnisse in diesem Zusammenhang mit großer Skepsis zu beurteilen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Enzyme des Tyrosinstoffwechsels der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala (Meigen) wurden untersucht:

1. Die Aktivitätskurve der Phenylalaninhydroxylase verläuft wie die anderer Enzyme des katabolischen Stoffwechsels U-förmig; sie sinkt in Puppen und steigt vor dem Schlüpfen wieder an. Eine direkte Ecdysonabhängigkeit besteht nicht. eine indirekte ist unwahrscheinlich.
2. Das Enzymsystem, das die Bildung des N-Acetyl-dopamin-glucosids aus N-Acetyl-dopamin katalysiert, ist schon zu einer Zeit vorhanden, zu der die Tiere die N-Acetyl-dopamin-Synthese nicht aufgenommen haben und praktisch kein Ecdyson ausgeschüttet wird.
3. Die Sklerotisierungssubstanz von Calliphora, N-Acetyl-dopamin, wurde erstmals kristallin gewonnen. Ihr Einfluß auf verschiedene Calliphora-Enzyme wurde untersucht; sie hemmt die Dopadecarboxylase in vivo, in vitro läßt sich zeigen, daß die Hemmung spezifisch ist: ein Beispiel für eine Rückkopplungshemmung im Stoffwechsel, bei der das Schlüsselenzym eines speziellen Stoffwechselweges durch das Endprodukt dieses Weges gehemmt wird.
4. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß N-Acetyl-dopamin auch die Tyrosindecarboxylase in vivo hemmt; eine physiologische Rolle dieses Effektes ist fraglich.
5. Einige bei angeborenen Störungen des Aminosäuren-Stoffwechsels des Menschen sich anhäufende α-Ketosäuren (Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, α-Keto-isovaleriansäure, α-Keto-isocapronsäure) hemmen die Dopadecarboxylase von Calliphora in vitro. Die mögliche Bedeutung dieser Resultate im Zusammenhang mit der Leucinose wurde diskutiert.
6. Durch Injektion von Pyridoxalphosphat in Dosen bis zu 10^{-3} mMol / g Lebendgewicht läßt sich in vivo die Hemmung der Dopadecarboxylase durch p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure aufheben und sogar umkehren, eine ähnlich auch bei Dopa- und 5-Hydroxy-tryptophan-Decarboxylasen aus Säugern bekannte Erscheinung.
7. Cystein stimuliert das Enzym in vitro, Glutathion nicht.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Methodik

a) Apparate :

Spektren wurden mittels folgender Apparate aufgenommen:

UV-Spektren: ZEISS - Spektralphotometer , Modell PM / M4 Q II

IR-Spektren: PERKIN - ELMER - Spektralphotometer, Modell 21

Für die Radioaktivitätsbestimmungen standen folgende Geräte zur Verfügung:

FRIESEKE & HOEPFNER - Gerät, Modell FH 149, mit Radiopapierchromatograph FH 7452, Endfensterzählrohr und automatischem Schreiber.

PACKARD - Szintillationszähler, Modell Tricarb, dabei wurde als Szintillationsgemisch T-Fluor verwendet (5 g PPO, o.2 g POPOP in 1 Liter Toluol p.a.).

Injektionen wurden mit DESAGA - Mikroinjektionsspritzen durchgeführt.

Papierelektrophoresen wurden auf einem in unserer Werkstatt gebauten Gerät ausgeführt.

b) Papierchromatographie:

Chromatographiepapiere:

SCHLEICHER & SCHÜLL 2o43 b

WHATMAN No. 4

Laufmittelsysteme

System 1: Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (Butanolphase)

System 2: Butanol, mit 1 n HCl gesättigt

c) Anfärbung von Chromatogrammen und Elektrophoresen:

Reagentien:

1.Diazotierte Sulfanilsäure (Paulys Reagens) zum Nachweis

von Phenolen und aromatischen Aminen (o.1 g diazotierte Sulfanilsäure in 20 ml 10 %-iger Na_2CO_3 - Lösung).
2. FOLINs Reagens für phenolische Substanzen.
3. Eine o.25 %-ige Lösung von Ninhydrin in Butanol zum Nachweis von Aminogruppen.
4. Ammoniakalische Silbernitratlösung nach PARTRIDGE (99) für reduzierende Substanzen.

d) Radioaktive Substanzen :

Vom Radiochemical Centre, Amersham, wurden folgende radioaktive Präparate bezogen:
1. Generell markierte ^{14}C-Glucose
2. Generell markiertes ^{14}C - Phenylalanin
3. Generell markiertes ^{14}C - Tyrosin
4. 2' - ^{14}C - D,L-Dopa

e) Versuchstier :

Larven von Calliphora erythrocephala (MEIGEN) wurden bei 20 - 25 °C Raumtemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit von 50 - 70 % auf magerem Rindfleisch gehalten.

f) Anfertigung von Homogenaten:

Die Tiere wurden in 80 %-igem Methanol im Glashomogenisator nach POTTER homogenisiert; die Homogenate 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert und nach Filtrieren am Rotationsverdampfer eingeengt.

g) Analyse:

Die Analyse der N-Acetyl-dopamin-Kristalle wurde im Laboratorium A.BERNHARDT im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr) durchgeführt.

2. Beschreibung der Versuche

N-Acetyl-dopamin-glucosid bildendes System:

Knapp 4-tägige Tiere erhielten Injektionen von 5o ooo dpm generell markierter Glucose - ^{14}C und 12oγ N-Acetyl-dopamin in 1o µl H_2O, Kontrolltiere nur 5o ooo dpm Glucose - ^{14}C im gleichen Volumen. Nach 6 (in einem Fall: 2) Stunden wurden je 6 Tiere homogenisiert und die Homogenate auf S & S 2o43 b in System 1 papierchromatographisch aufgetrennt. Färbung mit Paulys Reagens und Zählung im Radiopapierchromatogra - phen.

Aktivitätsverlauf der Phenylalaninhydroxylase :

Die Tiere aus allen benutzten Gelegen verpuppten sich zu Beginn des 9. und schlüpften am Anfang des 20. Lebenstages. Folgende Gelege wurden verwendet:

1) vom 4. - 19. Lebenstag
2) vom 4. - 1o. Lebenstag
3) vom 9. - 13. Lebenstag
4) vom 13, - 22. Lebenstag
   a) Fliegen (2o. - 22. Lebenstag) blieben ungefüttert
   b) " " " " " erhielten Rohrzucker- lösung.

Jedes Tier erhielt in 5 µl wässriger Lösung 5o ooo dpm generell markiertes Phenylalanin - C 14. Je 6 Tiere wurden 2 Stunden nach Injektion homogenisiert, die Homogenate auf Whatman No. 4 in System 1 papierchromatographiert. Bei Zählung im Radiopapierchromatographen fanden sich regelmäßig ein breiter, verschmierter Aktivitätsbereich vom Start bis R_f o.43 und ein sehr hoher Aktivitätsgipfel bei R_f o.6 (Phenylalanin). Andere Aktivitätsgipfel im Bereich von R_f o.7 - 1.o machten regelmäßig unter 5 % der wiedergefundenen Aktivität aus.

Der Bereich vom Start bis R_f o.7 wurde mit o.o25 n HCl

(o.5 ml / cm^2 Papier) 2 1/2 Stunden bei Zimmertemperatur eluiert und das Eluat nach Rotationsverdampfung in System 2 rechromatographiert, wobei jeweils 2 Aktivitätsgipfel bei R_f o.6 (Phenylalanin) und o.42 auftraten. Die o.42-Substanz erwies sich durch Vergleichschromatogramme und Farbreaktionen (Ninhydrin: violett, Folin: blau) als Tyrosin. Außer Phenylalanin und Tyrosin befanden sich in keinem Fall radioaktive Substanzen, deren Aktivität mehr als 1 % der wiedergefundenen Aktivität ausmachte, auf den 2.-Chromatogrammen.

Die 2.-Chromatogramme wurden in Abschnitten von je R_f o.o5 Breite im Szintillationszähler gezählt.

Zur Ausbeute: Zweimal wurden Tiere unmittelbar nach der Injektion wie angegeben aufgearbeitet; es wurden 56.5 und 55.3 % der gesamten injizierten Aktivität auf den 2.-Chromatogrammen wiedergefunden, davon über 99 % als Phenylalanin.

Schnürversuche:

6-tägige Tiere erhielten 24 Stunden (Versuchstiere) oder 5 min (Kontrolltiere) nach Abschnürung des 1. Körperdrittels 5o ooo dpm generell markiertes Phenylalanin - ^{14}C ins Abdomen injiziert und wurden nach 1 Stunde aufgearbeitet, wie eben beschrieben.

Kristallisation von N-Acetyl-dopamin:

8oo mg Dopaminhydrochlorid wurden in 16 ml Dioxan und 19 ml Acetanhydrid 6 Stunden unter N_2 am Rückflußkühler gekocht, wobei das Dopamin in Lösung ging. Nach Rotationsverdampfung wurde der Rückstand in 2o ml 11 % - iger äthanolischer HCl aufgenommen, die durch Einleiten von HCl-Gas in absolutes Äthanol erhalten worden war. Die Lösung blieb 40 Stunden bei 0° C unter N_2 stehen; dann wurde das nach Rotationsverdampfung braune Produkt in 4 ml Aqua dest. auf eine Säule mit 40 g Al_2O_3 (WOELM neutral, Stufe IV) übertragen. Die ersten, mit Essigsäureäthylester : Methanol = 9 : 1 eluierten Fraktio-

onen wurden verworfen, anschließend wurde mit einem 6.5 : 1 - Gemisch der gleichen Lösungsmittel eluiert, dabei wurden 350 mg eines schmierigen farblosen Produkts gewonnen, das papierchromatographisch (R_f in System 1 = o.8 ; Färbung mit diazotierter Sulfanilsäure = purpur) einheitlich war.

Je 175 mg des N-Acetyl-dopamins wurden in 4.5 ml Methanol : Aqua dest. = 1 : 4 aufgenommen ; beide Lösungen wurden unter N_2 lo min auf - 20 ° C gekühlt und nach Aufschießen der ersten Kristalle 20 Stunden bei 0 ° C aufbewahrt. Dann wurde die Mutterlauge abgehebert, es blieben 116 bzw. 78 mg weißer Nadeln zurück, die je einmal mit Benzol und Dichlormethan gewaschen und im Exsikkator über Paraffin (für mögliche Benzolreste) und P_2O_5 getrocknet wurden. Anschließend wurden die Kristalle in 3 bzw. 2.5 ml Methanol : Wasser = 1 : 4 aufgenommen und die Prozedur wiederholt. Es verblieben 95 bzw. 53 mg kristallinen N-Acetyl-dopamins, mit denen Spektren und Analyse durchgeführt wurden.

Erfolglos versuchte Lösungsmittel:

1. Petroläther / Methanol (verschiedene Verhältnisse) : Substanz kristallisierte nicht wieder aus.
2. Cyclohexan: zum Lösen der Substanz war ziemlich starkes Erwärmen nötig, beim Kühlen kristallisierte das Lösungsmittel zuerst aus.
3. Verschiedene Gemische mit Dichlormethan: N-Acetyl-dopamin löste sich, wenn überhaupt, nur nach starkem Erwärmen (was die Substanz nicht vertrug); in vielen Fällen trat außerdem Phasentrennung auf.
4. Essigsäureäthylester: N-Acetyl-dopamin wurde unter vorsichtigem Erwärmen gelöst, die Lösung wurde mit Petroläther übersättigt und bei - 4° C aufbewahrt: kein Auskristallisieren.
5. Pyridin: Vorversuche zeigten, daß sich Pyridin nur unter längerem Erwärmen wieder aus N-Acetyl-dopamin absaugen läßt; auf Pyridin-haltige Gemische wurde verzichtet.

Injektionen von N-Acetyl-dopamin und D,L-Dopa-2'-^{14}C in weiße Vorpuppen :

Weißen Vorpuppen, die sich auf Licht- und Berührungsreize noch wieder bewegten, wurden folgende Injektionen verab - reicht:

Versuch Nr.	Zeit zwischen Injekt. und Aufarbeitg.	Konzentration von N-Acetyl-dopamin in mMol / g Lebendgewicht.	DL-Dopa-2'-^{14}C / Tier (dpm)	Injektionsvolumen (µl)
1	25 min	VT 4.2×10^{-3}	30 000	6
		KT -	30 000	6
2	25 min	VT 3.9×10^{-3}	30 000	6
		KT -	30 000	6
3	25 min	VT 5.3×10^{-3}	30 000	6
		KT -	30 000	6
4	45 min	VT 3.4×10^{-3}	40 000	8
		KT -	40 000	8
5	45 min	VT 2.7×10^{-3}	35 000	7
		KT -	35 000	7

VT = Versuchstiere
KT = Kontrolltiere
dpm = Zerfälle / min (decays per minute).

Nach den angegebenen Zeiten wurden je 10 Tiere homogenisiert. Die Homogenate wurden auf S & S 2043 b in System 1 papierchromatographiert, die Chromatogramme im Radiopapierchromatographen gezählt und mit diazotierter Sulfanilsäure und ammoniakalischer $AgNO_3$ - Lösung angefärbt. Neben Dopa wurden folgende Metaboliten gefunden:

1. R_f = 0.35
   Mit diazotierter Sulfanilsäure rotorange Färbung
   Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ schwarze Färbung
   Ebenso verhielt sich zu Vergleichszwecken mitgelaufenes Dopamin (66,117).
2. R_f = 0.5 - 0.55
   Mit diazotierter Sulfanilsäure orange Färbung
   Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ keine Färbung
   In der Elektrophorese (Versuch 4 und 5) bei pH 7 keine Wanderung
   Das Verhalten ist typisch für das N-Acetyl-dopamin-glu-

cosid (66,111).

3. R_f = o.8
Mit diazotierter Sulfanilsäure purpurne Färbung
Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ schwarze Färbung
In der Elektrophorese (Versuch 4 und 5) bei pH 7 kaum merkliche Wanderung zum positiven Pol.
Ebenso verhielt sich zu Vergleichszwecken parallel-laufendes N-Acetyl-dopamin (66,111).

Bei Versuch 4 und 5 wurden die Zonen der Chromatogramme von R_f o.4 - o.6 und o.6 - o.8 in Äthanol eluiert und bei pH 7 in 1/15 m Phosphatpuffer papierelektrophoretisch untersucht. Säureprodukte machten unter 1 % der gesamten auf den Chromatogrammen gefundenen Aktivität aus (Zählung der Elektrophoresen in 1 cm breiten Abschnitten im Szintillationszähler), für den Nachweis mit Farbreaktionen war ihre Menge zu gering.

Injektionen von N-Acetyl-dopamin und generell markiertem Tyrosin-^{14}C in 4- und 5-tägige Larven:

Die verwendeten Injektionslösungen und Dosen sind in Tab. 5 (S.37) enthalten. Die nach den dort angegebenen Zeiten angefertigten Homogenate wurden auf S & S 2o43 b in System 1 papierchromatographiert. Die Chromatogramme wurden im Radiopapierchromatographen gezählt und mit Farbreagentien untersucht (s.u.).

Zur weiteren Auftrennung der Metaboliten wurden die Chromatogramme unterteilt:

a) Die Zone vom Start bis R_f o.45 wurde bei allen Versuchen in System 2 rechromatographiert, wobei regelmäßig nur ein Aktivitätsgipfel (R_f o.42) auftrat, der sich durch Vergleichschromatogramme und Farbreaktionen (Ninhydrin = violett, Folin = blau) als Tyrosin erwies. Dopa und Dopamin traten bei keinem Versuch in nachweisbaren Mengen auf.

3. R_f = o.8
Mit diazotierter Sulfanilsäure purpurne Färbung
Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ schwarze Farbe
Mit Ninhydrin Ø
Mit Folins Reagens blau
In der Elektrophorese bei pH 7 kaum merkliche Wanderung zum positiven Pol.
Ebenso verhielt sich das parallel-laufende N-Acetyl-dopamin.

4. R_f = o.9
Mit diazotierter Sulfanilsäure orangerote Farbe
Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ Ø
Mit Ninhydrin Ø
Mit Folins Reagens blaue Farbe
In der Elektrophorese bei pH 7 keine Wanderung
Ebenso verhielt sich parallel-laufendes N-Acetyl-tyramin.

5. R_f = o.75
Mit diazotierter Sulfanilsäure orange Farbe
Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ schwarze Farbe
Mit Ninhydrin Ø
Mit Folins Reagens blaue Farbe
In der Elektrophorese bei pH 7 Wanderung zum positiven Pol
Ebenso verhielt sich parallel-laufende p-Hydroxy-phenyl-brenztraubensäure

6. R_f = o.9
Mit diazotierter Sulfanilsäure rotorange Färbung
Mit ammoniakalischem $AgNO_3$ Ø
Mit Ninhydrin Ø
Mit Folins Reagens blaue Farbe
In der Elektrophorese bei pH 7 Wanderung zum positiven Pol
Ebenso verhielten sich die parallel laufenden Verbindungen p-Hydroxy-phenylpropion- und -essigsäure. Die erhaltenen Substanzmengen waren für eine weitere Auftrennung zu gering.

7. R_f o.45 - o.55
Keine Farbreaktionen

Wanderung in der Elektrophorese bei pH 7 zum positiven Pol
Offenbar nichtphenolische Säuren, oder phenolische Säuren in für einen Nachweis durch Farbreaktionen zu geringen Mengen.

Versuche zur Hemmbarkeit der Dopadecarboxylase in vitro :

Herstellung von Enzympräparaten:

Die Dopadecarboxylase wurde nach der von SEKERIS (113) angegebenen Methode angereichert. Die Cuticeln weißer Vorpuppen wurden gesammelt, dreimal in 1/15 m Phosphatpuffer pH 7.o gewaschen und im gleichen Puffer nach Zusatz von o.1 % Phenylthioharnstoff homogenisiert. Das Homogenat wurde lo min bei 3ooo Upm zentrifugiert und der Überstand zu 50 % mit $(NH_4)_2SO_4$ gesättigt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen, der Überstand bis zu 70 %-iger Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Der neue Niederschlag wurde abzentrifugiert und im kleinstmöglichen Volumen o.ool m Phosphatpuffer pH 7 aufgelöst. Das Ammoniumsulfat wurde durch Gelfiltration an Sephadex G 50 entfernt. Die so erhaltenen Präparate dienten als Enzymlösungen und wurden bei genügend hoher Dopadecarboxylase-Aktivität mit o.ool m Phosphatpuffer pH 7.o verdünnt.

Zur Klärung des Hemmungsmechanismus des N-Acetyl-dopamins (kompetitiv, nicht kompetitiv?) wurde zweimal versucht, ein hochgereinigtes Präparat zu gewinnen. Dazu wurden größere Mengen der beschriebenen Präparationen auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben und mit von o.ool bis o.1 m steigenden Konzentrationen von Phosphatpuffer pH 7.2 eluiert. Aus nicht geklärten Gründen konnte keine Enzymaktivität von den Säulen zurückgewonnen werden (bei früheren Präparationen hatte SEKERIS (113) in den mit o.1 m Phosphatpuffer eluierten Fraktionen das Enzym hochgereinigt erhalten).

Die Testansätze enthielten jeweils o.5 ml Enzymlösung, alle restlichen Versuchsdaten finden sich in Tab. 8 (S. 43 und 44).

Die Reaktion wurde nach den in Tab. 8 angegebenen Zeiten durch Zugabe des 4-fachen Volumens Methanol gestoppt, die entstandenen Lösungen wurden wie Homogenate weiterbehandelt und

auf S & S 2o43 b in System 1 papierchromatographiert (der R_f-Wert von Dopa betrug o.2, der von Dopamin o.35) und nacheinander im Radiopapierchromatographen und Szintillationszähler gemessen. Die Resultate stimmten überein.

Injektionen von p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, Pyridoxalphosphat und Dopa-2'-C 14 in weiße Vorpuppen:

Jedes Tier erhielt in wässriger Lösung zusammen mit den in Tab. 9 (S.47) angegebenen Substanzen (von denen die p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure durch Ultrabeschallung gelöst werden mußte) lo ooo dpm DL-Dopa-2'-C 14. Je 5 Tiere wurden nach 65 min homogenisiert und die Homogenate in System 1 auf S & S 2o43 b papierchromatographiert. Weitere Auswertung wie auf S.65 beschrieben. Die Chromatogramme wurden nach der Zählung im Radiopapierchromatographen noch im Szintillationszähler gemessen, die Ergebnisse stimmten unter Berücksichtigung der verschiedenen Ausbeute in beiden Geräten überein.

Ansätze von Pyridoxalphosphat und Dopa oder N-Acetyl-dopamin

Der radioaktive Ansatz wurde in System 1 papierchromatographiert und anschließend unter einer UV-Lampe bei 350 mμ und im Radiopapierchromatographen untersucht (Tab. lo, Abschnitt B). Alle übrigen Versuchsbedingungen sind in Tab. lo (S. 49) enthalten.

F. LITERATUR

1. AGRELL, I: "Localization of some hydrogen-activating enzymes in insects during metamorphosis"
Nature (Lond.) 164, 1039 (1949)

2. ALVORD, E.C., L.D.STEVENSON, F.S.VOGEL und R.L.ENGLE: "Neuropathological findings in phenylpyruvic oligophrenia (phenyl-ketonuria)"
J.Neuropath.exp.Neurol. 9,298 (1950)

3. ANDÉN, N., A.CARLSSON, A.DAHLSTRÖM, K.FUXE, N.A. HILLARP und K.LARSSON: "Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons"
Life Sci. 3, 523 (1964)

4. ANDERSON, S.O.: "The cross-links in resilin identified as dityrosine and trityrosine"
Biochim.biophys.Acta 93, 213 (1964)

5. AVERY, O.T., C.M.MacLEOD und M.McCARTY: "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III"
J.exp.Med. 79,137 (1944)

6. AWAPARA, J., R.P.SANDMAN und C.HANLY: "Activation of DOPA decarboxylase by pyridoxal phosphate"
Arch. Biochem. 98, 520 (1962)

7. BELLAMY, L.J.: "The infrared spectra of complex molecules"
Methuen (London/New York), 1962

8. BEŁŻECKA, K., T.LASKOWSKA und I.MOCHNACKA: "Hydroxylation of phenylalanine in insects and some vertebrates"
Acta biochim. polon. 11, 191 (1964)

9. BICKEL, H.: "The effects of a phenylalanine-free and a phenylalanine-poor diet in phenylpyruvic oligophrenia"
Exp.Med.Surg. 12,114 (1954)

10. BOSCOTT, R.J. und H.BICKEL: "Detection of some new abnormal metabolites in the urine of phenylketonuria"
Scand. J. clim. Lab. Invest. 5, 380 (1953)

11. BOYLEN, J. und J.H.QUASTEL: "Effects of L-phenylalanine and sodium phenylpyruvate on the formation of adrenaline from L-tyrosine in adrenal medulla in vitro"
Biochem. J. 80, 644 (1961)

12. BRUNET, P.C.J.: "The metabolism of aromatic compounds" in T.W.GOODWIN (Hrsg.) "Aspects of insect biochemistry"
Biochem. Soc. Sympos. No. 25 (London, 1.4.1965), Acad. Press, London, 1965

13. BRUNET, P.C.J. und P.W.KENT: "Observations on the mechanism of a tanning reaction in Periplaneta and Blatta" Proc. roy. Soc. B 144, 259 (1955)

14. BUTENANDT, A., U.GRÖSCHEL, P.KARLSON und W.ZILLIG: "Über N-Acetyl-tyramin, seine Isolierung aus Bombyx-Puppen und seine chemischen und biologischen Eigenschaften" Arch. Biochem. 83, 76 (1959)

15. BUTENANDT,A., W.WEIDEL und E.BECKER: "Kynurenin als Augenpigmentbildung auslösendes Agens bei Insekten" Naturwissenschaften 28, 63 (194o)

16. BUTENANDT,A., W.WEIDEL und M.SCHLOSSBERGER: "3-Oxy-kynurenin als cn+-Gen-abhängiges Glied im intermediären Tryptophan-Stoffwechsel" Z. Naturforschung 4b, 242 (1949)

17. CANELLAKIS, N. und P.P.COHEN: "Kinetic and substrate specificity of tyrosine-α-ketoglutaric acid transaminase" J. biol. Chem. 222, 63 (1956)

18. CARRUTHERS, C.: "Biochemistry of skin in health and disease", Kapitel 3 "Pigmentation" , p.43 Thomas, Springfield/Ill., 1962

19. CLARK, W.G.: "Inhibition of amino acid decarboxylase" in R.M.HOCHSTER und J.H.QUASTEL (Hrsg.) "Metabolic inhibitors" , Vol.I, Kapitel 9, p. 315 ff Acad. Press, New York, 1963
a) p. 32o/1
b) p. 36o/1

2o. CLEVER, U. und P.KARLSON: "Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson" Exp. Cell Res. 2o, 623 (196o)

21. COLHOUN, E.H.: "Aspects of biologically active substances in insects with particular reference to the cockroach, Periplaneta americana" in D.RICHTER (Hrsg.) "Comparative Neurochemistry", p.333 Pergamon Press, Oxford/London, 1964

22. COTZIAS, G.C., P.S.PARAVASILIOU, M.H.v.WOERT und A.SAKAMOTO: "Melanogenesis and extrapyramidal diseases" Fed. Proc. 23, 713 (1964)

23. CREVELING, C.R., M.LEVITT und S.UDENFRIEND: "An alternative route for biosynthesis of norepinephrine" Life Sci. 1, 523 (1962)

24. CROME, L., G.DUTTON und C.F.ROSS: "Maple syrup urine disease" J.Path.Bact. 81, 379 (1961)

25. DAHM, K.H., H.RÖLLER und B.M.TROST: "The juvenile hormone. IV. Stereochemistry of juvenile hormone and biological activity of some of its isomers and related compounds" Life Sci. 7, 129 (1968)

26. DALGLIESH, C.E. und H.TABECHIAN: "Comparison of the metabolism of uniformly ^{14}C-labelled L-phenylalanine, L-tyrosine and L-tryptophan in the rat"
Biochem. J. 62, 625 (1956)

27. DANCIS, J., J.HUTZLER und M.LEVITZ: "Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease"
Biochim. biophys. Acta 43, 342 (1960)

28. DREYFUS, P.M. und A.L.PRENSKY: "Further observations on the biochemical lesion in maple syrup urine disease"
Nature 214, 276 (1967)

29. EMBDEN, G. und K.BALDES: "Über den Abbau des Phenylalanins im tierischen Organismus"
Biochem. Z. 55, 301 (1913)

30. FEIGELSON, P., M.FEIGELSON und O.GREENGARD: "Comparison of the mechanisms of hormonal and substrate induction of rat liver tryptophan pyrrolase"
in G.PINCUS (Hrsg.) "Recent progress in hormone research" 18, 491 (1962)

31. FELLMAN, J.H.: "Inhibition of DOPA decarboxylase by aromatic acids associated with phenylpyruvic oligophrenia"
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 93, 413 (1956)

32. FÖLLING, A.: "Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 227, 169 (1934)

33. FRAENKEL, G. und C.HSIAO: "Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects"
J. Ins. Physiol. 11, 513 (1965)

34. FRIEDMAN, S. und S.KAUFMAN: "3,4-dihydroxyphenylethylamine-β-hydroxylase: a copper protein"
J. biol. Chem., PC 552 (1965)

35. FUKUDA, T.: "Conversion of phenylalanine into tyrosine in the silkworm larva (Bombyx mori)"
Nature (Lond.) 177, 429 (1956)

36. FURNEAUX, P.J.S. und J.E.McFARLANE: "Identification, estimation and localization of catecholamines in eggs of the house cricket, Acheta domesticus (L.)"
J. Ins. Physiol. 11, 591 (1965)

37. FUXE, K. und N.-A.HILLARP: "Uptake of L-dopa and noradrenaline by central catecholamine neurons"
Life Sci. 3, 1403 (1964)

38. GILMOUR, D.: "The biochemistry of insects"
Acad. Press, New York, 1961

39. GJESSING, L.R.(Hrsg.): "Symposium on tyrosinosis"
Universitetsforlaget, Oslo, 1966
a)G.MEDES "Tyrosinosis", p.15
b)L.[illegible]IF "Infants lacking p-hydroxy-phenyl-pyruvate hydroxylase", p.24

4o. GOLDSTEIN, F.B.: "Studies on phenylketonuria II. The excretion of N-acetyl-phenylalanine in phenylketonuria"
Biochim. biophys. Acta 71, 2o4 (1963)

41. GRUMER, H.D.: "Formation of hippuric acid from phenylalanine labelled with carbon-14 in phenylketonuric subjects"
Nature 189, 63 (1961)

42. GRÜTER, W.: "Angeborene Stoffwechselstörungen und Schwachsinn am Beispiel der Phenylketonurie"
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1963

43. GURIN, S. und A.M.DELLUVA: "The biological synthesis of radioactive adrenalin from phenylalanine"
J. biol. Chem. 17o, 545 (1947)

44. GUROFF, B. und S.UDENFRIEND: "Studies on aromatic amino acid uptake by rat brain in vivo"
J. biol. Chem. 237, 8o3 (1962)

45. HANSON, A.: "Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine metabolites"
Naturwissenschaften 45, 423 (1958)

46. HARTMAN, W., R.I.AKAWIE und W.G.CLARK: "Competitive inhibition of 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) decarboxylase in vitro"
J. biol. Chem. 216, 5o7 (1955)

47. HILLMAN, G.: "Biosynthese und Stoffwechselwirkung der Schilddrüsenhormone"
Thieme, Stuttgart, 1961

48. HOLTZ, P.: "Chemischer Nachweis der fermentativen Tyraminbildung durch Nierengewebe"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 251, 226 (1938)

49. HOLTZ, P.: "Dopadecarboxylase"
Naturwissenschaften 27, 724 (1939)

5o. HUANG, I. und D.Y.-Y. HSIA: "Studies on inhibition of 5-hydroxy-tryptophan decarboxylase by phenylalanine metabolites"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112, 81 (1963)

51. HUBER, R. und W.HOPPE: "Zur Chemie des Ecdysons VII: Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode"
Chem. Ber. 98, 24o3 (1965)

52. IKEDA, M., M.LEVITT und S.UDENFRIEND: "Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase"
Arch. Biochem. 12o, 42o (1967)

53. JACOBY, G.A. und B.N.LADU: "Studies on the specificity of tyrosine-α-ketoglutarate transaminase"
J. biol. Chem. 239, 419 (1964)

54. JERVIS, G.A.: "Studies on phenylpyruvic oligophrenia.Phenylpyruvic acid content of blood"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 81, 715 (1952)

55. JERVIS, G.A.: "Phenylpyruvic oligophrenia. Deficiency of phenylalanine-oxidising system"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 82, 514 (1953)

56. KARLSON, P.: "Biochemical studies on insect hormones"
Vitam. and Horm. 14, 227 (1956)

57. KARLSON, P.: "Biochemische Wirkungsweise der Hormone"
Dtsch. med. Wschr. 86, 668 (1961)

58. KARLSON, P.(Hrsg.): "Mechanisms of hormone action"
Thieme/Acad.Press, Stuttgart/New York, 1965

59. KARLSON, P. und H.AMMON: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten XI. Biogenese und Schicksal der Acetylgruppe des N-Acetyl-dopamins"
Hoppe-Seylers Z.physiol. Chem. 330, 161 (1963)

59I. KARLSON,P. und C.BODE:"Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung, V. Die Inaktivierung des Ecdysons bei der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala Meigen"
J.Ins.Physiol., im Druck

60. KARLSON,P. H.HOFFMEISTER, H.HUMMEL, F.P.HOCKS und G.SPITTELER: "Zur Chemie des Ecdysons VI. Reaktionen des Ecdysonmoleküls"
Chem. Ber. 98, 2394 (1965)

61. KARLSON,P., D.MERGENHAGEN und C.E.SEKERIS: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten XV. Weitere Untersuchungen über das o-Diphenoloxydase-System von Calliphora erythrocephala"
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 338, 42 (1964)

62. KARLSON,P. und A.SCHWEIGER: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten IV. Das Phenoloxydase-System von Calliphora und seine Beeinflussung durch das Hormon Ecdyson"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 323, 199 (1961)

63. KARLSON, P. und C.E.SEKERIS: "N-Acetyl-dopamine as sclerotizing agent of the insect cuticle"
Nature (Lond.) 195, 183 (1962)

64. KARLSON,P. und C.E.SEKERIS: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten IX. Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels durch Ecdyson"
Biochim. biophys. Acta 63, 489 (1962)

65. KARLSON,P., C.E.SEKERIS und F.HERRLICH:"Über neue Dopaminmetaboliten im Harn beim bösartigen Phäochromozytom"
Dtsch. med. Wschr. 88, 1873 (1963)

66. KARLSON,P., C.E.SEKERIS und K.E.SEKERI: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VI. Identifizierung von N-Acetyl-3,4-dihydroxy-β-phenäthylamin (N-Acetyl-dopamin) als Tyrosinmetabolit"
Hoppe-Seylers Z.physiol. Chem. 327, 86 (1962)

67. KAUFMAN, S.: "The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor"
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 5o, 1o85 (1963)

68. KAUFMAN, S.: "Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor"
J. biol.Chem. 242, 3934 (1967)

69. KENNEY, F.T. und R.M.FLORA: "Induction of tyrosine-x-ketoglutarate transaminase in rat liver"
J. biol.Chem. 236, 2699 (1961)

7o. KNOX, W.E.: "Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary-adrenal system"
Brit. J. exp. Path. 32, 462 (1951)

71. KNOX, W.E. und S.W.EDWARDS: "Coenzyme function of glutathione in cis-trans isomerization"
Fed. Proc. 13, 242 (1954)

72. KNOX, W.E. und M.LeMAY-KNOX: "The oxydation in liver of L-tyrosine to acetoacetate through p-hydroxyphenylpyruvate and homogentisic acid"
Biochem. J. 49, 686 (1951)

73. LABRIE, F. und A.KORNER: "Actinomycin-sensitive induction of tyrosine transaminase and tryptophan pyrrolase by amino acids and tryptophan"
J. biol.Chem. 243, 1116 (1968)

7. LABRIE, F. und A.KORNER: "Growth hormone inhibition of hydrocortisone induction of tyrosine transaminase and tryptophan pyrrolase and its reversal by amino acids"
J. biol.Chem. 243, 112o (1968)

741.LADU, B.N.: "The enzymatic deficiency in tyrosinemia"
Am. J. Dis. Child. 113, 54 (1967)

75. LADU, B.N., V.G.ZANNONI, L.L.LASTER und J.E.SEEGMILLER: "The nature of the defect in tyrosine metabolism in alcaptonuria"
J. biol.Chem. 23o, 251 (1958)

76. LEVIN, E.Y., B.LEVENBERG und S.KAUFMAN: "The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamin to norepinephrine"
J.biol. Chem. 235, 2o8o (196o)

77. LIN, E.C.C. und W.E.KNOX: "Adaptation of the rat liver tyrosine-α-ketoglutarate transaminase"
Biochim. biophys. Acta 26, 85 (1957)

78. LINNEWEH, F. und M.EHRLICH: "Zur Pathogenese des Schwachsinns bei Phenylketonurie"
Klin. Wschr. 4o, 225 (1962)

79. LOO, Y.H.: "Characterization of a new phenylalanine metabolite in phenylketonuria"
J.Neurochem. 14, 813 (1967)

8o. LOVENBERG, W.. H.WEISSBACH und S.UDENFRIEND: "Aromatic L-amino acid decarboxylase"
J. biol. Chem. 237, 89 (1962)

81. MARMARAS,V.J., C.E.SEKERIS und P.KARLSON: "Activity of 5-hydroxytryptophan decarboxylase during development of the blow-fly Calliphora erythrocephala, in relation to the ecdysone titer"
Acta biochim. polon. 13, 3o5 (1966)

82. MEDES, G.: "A new error of tyrosine metabolism: tyrosinosis"
Biochem. J. 26, 917 (1932)

83. MENKES, J.H.: "Cerebral lipids in phenylketonuria"
Pediatrics 37, 967 (1966)

84. MILLS, R.R., S.ANDROUNY und F.R.FOX: "Correlation of phenoloxidase activity with ecdysis and tanning hormone release in the american cockroach"
J. Ins. Physiol. 14, 6o3 (1968)

85. MILLS, R.R., C.R.LAKE und W.L.ALWORTH: "Biosynthesis of N-Acetyl-dopamine by the american cockroach"
J. Ins. Physiol. 13, 1539 (1967)

86. MILLS, R.R. und D.J.NIELSEN: "Hormonal control of tanning in the american cockroach - V. Some properties of the purified hormone"
J. Ins. Physiol. 13, 273 (1967)

87. MITCHELL, H.K., P.S.CHEN und E.HADORN: "Tyrosine phosphate on paper chromatograms of Drosophila melanogaster"
Experientia 16, 41o (196o)

88. MITOMA, C.: "Studies on partially purified phenylalanine hydroxylase"
Arch. Biochem. 6o, 476 (1956)

89. MITOMA, C., R.M.AULD und S.UDENFRIEND: "On the nature of enzymatic defect in phenylpyruvic oligophrenia"
Proc. Soc. exp. Biol. 94, 634 (1957)

9o. MKHEYAN, E.E.: "Change in the content of cerebrosides in brain of white rats during adrenaline stimulation.III."
Izv. Akad. Nauk. Arm. S.S.R., Biol.Nauki 16,43 (1963)
(Original russisch, zit. nach: Chem.Abstr. 6o, 11 oo8 h, 1964)

91. MONOD, J.: "Biosynthese eines Enzyms. Information, Induktion, Repression"
Angew. Chemie 71, 685 (1959)

92. MONOD, J., J.-P.CHANGEUX und F.JACOB: "Allosteric proteins and cellular control systems"
J. molec. Biol. 6, 3o6 (1963)

93. NADLER, H.L. und D.Y.-Y.HSIA: "Epinephrine metabolism in phenylketonuria"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1o7, 721 (1961)

94. NAGATSU, T., M.LEVITT und S.UDENFRIEND: "Tyrosine hydroxylase"
J. biol. Chem. 239, 291o (1964)

95. NAGATSU, T. und K.TAKEUCHI: "The effect of high phenylalanine concentration on the formation of DOPA from phenylalanine and tyrosine by tyrosine hydroxylase"
Experientia 23, 532 (1967)

96. O.NEUBAUER und H.FALTA: "Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkaptonurie"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 42, 81 (19o4)

97. OATES, J.A., P.Z.NIRENBERG, J.B.JEPSON, A.SJOERDSMA und S.UDENFRIEND: "Conversion of phenylalanine to phenethylamine in patients with phenylketonuria"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112, 1o78 (1963)

98. OKUBO, S.: "Occurence of N-acetylhydroxytyramine glucoside in Drosophila melanogaster"
Med. J. Osaka Univ. 9, 327 (1958)

99. PARTRIDGE, S.M.: "Application of the paper partition chromatogram to the qualitative analysis of reducing sugars"
Nature (Lond.) 158, 27o (1946)

1oo. PETRACK, B., F.SHEPPY und V.FETZER: "Studies on tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla"
J.biol.Chem. 243, 743 (1968)

1o1. PRENSKY, A.L. und H.W.MOSER: "Brain lipids, proteolipids and free amino acids in maple syrup urine disease"
J.Neurochem. 13, 863 (1966)

1o2. PRYOR, M.G.M.: "Sclerotization"
in M.FLORKIN und H.S.MASON (Hrsg.) "Comparative Biochemistry", Vol. IV, p. 371 - 396, Acad. Press, New York, 1963.

1o3. PRYOR, M.G.M., P.B.RUSSELL und A.R.TODD: "Phenolic substances concerned in hardening the insect cuticle"
Nature (Lond.) 159, 399 (1947)

1o4. RAVDIN, R.G., und D.I.CRANDALL: "The enzymatic conversion of homogentisic acid to 4-fumarylacetoacetic acid"
J.biol.Chem. 189, 137 (1951)

1o5. SCHALES, O. und S.S.SCHALES: "Dihydroxyphenylalanine decarboxylase: preparation and properties of a stable dry powder"
Arch. Biochem. 24, 83 (1949)

1o6. SCHEPARTZ, B.: "Inhibition and activation of the oxidation of homogentisic acid"
J. biol. Chem. 2o5, 185 (1953)

1o7. SCHEPARTZ, B. und S.GURIN: "The intermediary metabolism of phenylalanine labeled with radioactive carbon"
J. biol. Chem. 18o, 663 (1949)

1o8. SCHMALFUSS, H. und H.-P. MÜLLER: "Über das Hautskelett von Insekten. Über Dioxyphenylalanin in den Flügeldecken von Maikäfern"
Biochem. Z. 183, 362 (1927)

1o9. SCHOTT, H.F. und W.G.CLARK: "Dopa decarboxylase inhibition through the interaction of coenzyme and substrate"
J. biol. Chem. 196, 449 (1952)

11o. SCHWEIGER, A. und P.KARLSON: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten X. Die Aktivierung der Präphenoloxydase und das Aktivatorenzym"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 21o (1962)

111. SEKERIS, C.E.: "Zur vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels"
Dissertation, München 1962

112. SEKERIS, C.E.: "Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels der Fliegen durch Ecdyson"
Tagung d. Ges. f. physiol. Chem., Wien Sept. 1962

113. SEKERIS, C.E.: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten XII. Reinigung, Eigenschaften und Substratspezifität der Dopa-Decarboxylase"
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 332, 7o (1963)

114. SEKERIS, C.E.: "Sclerotization in the blowfly imago"
Science 144, 419 (1964)

115. SEKERIS, C.E.: "Inhibition of phenoloxydase-catalyzed transformation of tyrosine to melanine by hydroxyphenyl carboxylic acids"
Experientia 22, 25o (1966)

116. SEKERIS, C.E.: unveröffentlicht

117. SEKERIS, C.E. und P.KARLSON: "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VII. Der katabolische Abbau des Tyrosins und die Biogenese der Sklerotisierungssubstanz, N-Acetyl-dopamin"
Biochim. biophys. Acta 62, 1o3 (1962)

118. SEKERIS, C.E. und P.KARLSON: "Biosynthesis of catecholamines in insects"
Pharmacol. Rev. 18, 89 (1966)

119. SEKERIS, C.E. und N.LANG: "Induction of dopa-decarboxylase activity by insect messenger RNA in an in vitro amino acid incorporating system from rat liver"
Life Sci. 3, 625 (1964)

12o. SHAAYA, E. und P.KARLSON: "Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung - II. Die postembryonale Entwicklung der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala Meig."
J.Ins.Physiol. 11, 65 (1965)

121. SHAAYA, E. und C.E.SEKERIS: "Ecdysone during insect development III. Activities of some enzymes of tyrosine metabolism in comparison with ecdysone titer during the development of the blowfly, Calliphora erythrocephala Meig."
Gen. comp. Endocr. 5, 35 (1965)

122. SMITH, J.N.: "Comparative detoxication"
Biochem. J. 6o, 436 (1955)

123. STANBURY, J.B., J.B.WYNGAARDEN und D.S.FREDRICKSON: "The metabolic basis of inherited disease"
McGraw-Hill Book Company, New York 196o

a) J.DANCIS und M.LEVITZ: "Maple syrup urine disease", p.473
b) T.B.FITZPATRICK:"Albinism", p.428
c) W.E.KNOX: "Phenylketonuria", p.321
d) B.N.LADU: "Alcaptonuria", p.394

124. TANIGUCHI, K., T.KAPPE und M.D.ARMSTRONG: "Further studies on phenylpyruvate oxidase"
J. biol. Chem. 239, 3389 (1964)

125. TASHIAN, R.E.: "Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria"
Metabolism 1o, 393 (1961)

126. UDENFRIEND, S. und J.R.COOPER: "The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine"
J. biol. Chem. 194, 5o3 (1952)

127. VANDERWENDE, C.: "Studies on the oxidation of dopamine to melanin by rat brain"
Arch. int. Pharmacodyn. 152, 433 (1964)

128. WAKU, Y. und L.I.GILBERT: "The corpora allata of the silkmoth, Hyalophora cecropia: an ultrastructural study"
J. Morph. 115, 69 (1964)

129. WALLACE, H.W., K.MOLDAVE und A.MEISTER: "Studies on conversion of phenylalanine to tyrosine in phenylpyruvic oligophrenia"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 94, 632 (1957)

130. WEIL-MALHERBE, H. und A.D.BONE: "The level of adrenaline in human plasma and its relation to mental activity"
J. ment. Sci. 101, 733 (1955)

131. WOLKOW, M. und E.BAUMANN: "Ueber das Wesen der Alkaptonurie"
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 15, 228 (1891)

132. WOOLF, L.I. und D.G.VULLIAMY: "Phenylketonuria with a study of the effect upon it of glutamic acid"
Arch. Dis. Childh. 26, 487 (1951)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg:

Antoni, Bopp, Brauer, Decker, Fischer, Fleckenstein, Genzel, Gerlach, Goerttler, Hassenstein, Hauenschild, Holzer, Keller, Koehler, Koslowski, Lüdtke, Lüttringhaus, Oehlkers, Puff, Rose, Schmidt, U.Schmidt, Stärk, Staubesand, Stegmüller, Tiedemann, Wiemers.

an der Ludwig-Maximilians-Universität München:

Bauer, Bickenbach, Braunbehrens, Büngeler, Dannenberg, Dontenwill, Eder, Eyer, Frick, Georgii, Jakob, Karlson, Kiese, Knedel, Kolle, Leibbrand, Lob, Löblich, May, Meyer, Oberniedermayr, Schwiegk, Schwink, Semm, Seitz, Waidl, Zenker.

an der Philipps-Universität Marburg:

Beckmann, Behrend, Berendes, Braun-Falco, Buchholz, Cleve, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Hardewig, Hartmann, Heuser, Hildebrandt, Karlson, Knauff, Kunz, Lang, Linneweh, Lübbers, Marx, Neubauer, Oehme, Oehmig, Poetschke, Rodeck, Rohen, Schiff, Schleyer, W.Schmid, F.W.Schmidt, Schürmann, Schwaiger, Sekeris, Siegert, Siess, Staib, Straub, Streicher, Würterle.